

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

René MALLEIN

Docteur en Pharmacie

Ancien Interne des Hôpitaux de Lyon

Attaché de recherches au C.N.R.S.

PREMIÈRE THÈSE. — "CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES EPOXYDES DE RETINENE,
ET DE VITAMINE A₁".

DEUXIÈME THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 17 Décembre 1951 devant la Commission d'examen

M. COURTY	<i>Président</i>
M. MEUNIER	} <i>Examineurs</i>
M. MENTZER.....	

1951

PROPOSAL

FOR THE CONSTRUCTION OF A BRIDGE AT THE MOUTH OF THE RIVER

AT THE MOUTH OF THE RIVER

IN THE DISTRICT OF THE MOUNTAINS

1897

THE MOUNTAINS

THE MOUNTAINS
THE MOUNTAINS
THE MOUNTAINS

THE MOUNTAINS
THE MOUNTAINS

THE MOUNTAINS
THE MOUNTAINS

THE MOUNTAINS

THE MOUNTAINS

THE MOUNTAINS

THE MOUNTAINS

T H E S E S

Présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE LYON

pour obtenir le grade

DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

René M A L L E I N

Docteur en Pharmacie
Ancien Interne des Hôpitaux de Lyon
Attaché de recherches au C.N.R.S.

1^{ère} Thèse : "CONTRIBUTION A L'ETUDE DES EPOXYDES DE
RETINENE₁ ET DE VITAMINE A₁" .

2^{ème} Thèse : PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE .

Soutenues le 17 Décembre 1951

devant la Commission d'Examen

Président : M. COURTY

Examineurs { MM. MEUNIER
MENTZER

T H E S I S

Présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

pour obtenir le grade

DE DOCTEUR EN SCIENCES NATURELLES

par

M. J. L. E. I. R.

Docteur en Pharmacie
Ancien Interne des Hôpitaux de Lyon
Attaché de recherches au C.N.R.S.



1ère Thèse : "Sur la structure des hypoxanthine et de l'acide urique".

2ème Thèse : "Propriétés chimiques des sels de la vitamine".

Représentée le 17 décembre 1951

devant la Commission d'Examen

Président : M. COURTET

Examinateurs :
M. KUNZ
M. MONTAUDO

UNIVERSITE DE LYON - FACULTE DES SCIENCES

Doyen M. DOUIN

Assesseur

M. EYRAUD Calcul différentiel et intégral.

Doyen Honoraire

M. LONGCHAMBON

Professeurs Honoraires

MM. VESSIOT
DULAC
VANEY

MM. MEUNIER
SIRE
FRAMAGEOT

MM. LOCQUIN
De LARAMBERGUE

Professeurs

MM. LONGCHAMBON	Minéralogie
DOUIN	Botanique
DEJARDIN	Physique
SOLLAUD	Zoologie
THIBAUD	Physique Expérimentale
EYRAUD	Calcul Différentiel et Intégral
THORAL	Géologie
POEUVRE	Chimie organique
CORDIER	Physiologie
PRETTRE	Chimie Industrielle
KUHNER	Botanique
COURTY	Chimie Physique
AUMERAS	Chimie
MALECOT	Mécanique rationnelle
PARIS	Chimie Minérale
BERNARD	Physique Générale
VIRET	Géologie
BERNARD	Chimie
COLONGE	Chimie

Maîtres de Conférences et chargés de cours

MM. MEUNIER	Chimie Biologie
GILLES	Botanique
JANIN	Physique Générale
MOUSSA	Physique
WAUTIER	Biologie animale
Mme CHAIX	Chimie Phys.
MM. BRACONNIER	Mathématiques
NIGON	Zoologie
MENTZER	Chimie Biologique
CUEILLERON	Chimie

Chargés de cours complémentaires

MM. DUFAY	Astronomie & Phys. Sup.
STRIFFLING	Météorologie
PELLETIER	Géologie
FIASSON	Zoologie
Mme FIASSON S.	Zoologie
MM. GAUTHIER J.	Chimie
MAZENOT	Géologie
GAUTHIER H.	Géologie
MURET	Botanique
MESNARD	Physique
TRANCHAT	Physique

Secrétaire

M. ROUX

A tous les miens

- A nos juges

- A Monsieur le Professeur C. COURTY

Il nous a fait le grand honneur de
juger ce travail et d'accepter la présidence
de notre jury de thèse. Nous le prions de
croire à l'expression de notre profond respect.

- A notre Maître, Monsieur le Professeur P. MEUNIER

C'est lui qui nous a inspiré le sujet de ce travail et, au cours des années passées dans son laboratoire, il a guidé nos recherches dans le domaine de la vitamine A avec toute sa compétence et tout son enthousiasme.

Qu'il nous permette de lui exprimer notre profonde reconnaissance et notre respectueux attachement.

- A Monsieur le Professeur C. MENTZER

Cette nouvelle marque d'estime qu'il nous témoigne nous touche profondément. Nous avons souvent eu recours à ces vastes connaissances en Chimie Organique et nous lui disons toute notre respectueuse gratitude.

- A Monsieur le Professeur A. BADINAND
.....
Pharmacien des Hôpitaux de Lyon

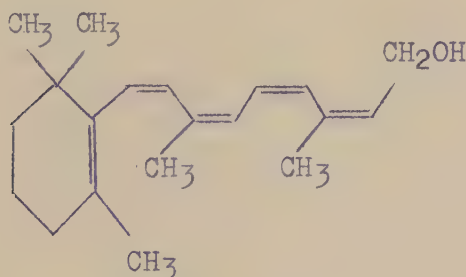
- AU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE
.....
DE LA FACULTE DES SCIENCES DE LYON
.....

INTRODUCTION

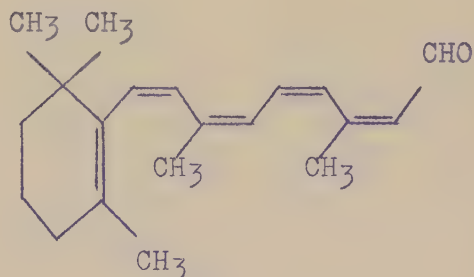
La guérison de certaines lésions oculaires chez des peuplades très primitives par ingestion de foie crû, remède déjà conseillé par Hippocrate à ses malades atteints d'héméralopie, n'est qu'une étape dans la recherche de cet " indéterminé alimentaire ", ainsi que l'appelait Hopkins, que l'on sût peu à peu reconnaître dans certains aliments par son action sur des troubles oculaires graves.

L'identification chimique de la vitamine A₁ par Karrer, en 1932, apportait une conclusion à cette lente évolution et permettait d'étudier l'influence de ce facteur de croissance liposoluble sur les phénomènes de la vision.

Kuhne avait extrait en 1879 le premier pigment rétinien photosensible qu'il nomma rhodopsine. Wald en 1935 montre alors les relations entre la vitamine A₁ et les photopigments de la rétine, puis il extrait de rétines décolorées à la lumière un corps auquel il donne le nom de "rétinène". Morton et Goodwin l'identifient, en 1944, à l'aldéhyde de la vitamine A₁ et apportent ainsi une confirmation aux travaux de Wald.



Vitamine A₁



Rétinène₁

Morton et Goodwin préparant le rétinène₁ par oxydation permanganique de l'axérophtol, signalèrent la formation d'un corps dont P. Meunier entreprit l'étude dès 1948 et qu'il nomma corps "Y". C'est ce composé qui fait l'objet de ce travail.

La PREMIERE PARTIE est consacrée à l'étude de la préparation et de la structure chimique du corps "Y". Son activité biologique chez le rat blanc carencé en vitamine A₁ nous conduit ensuite à envisager le rôle possible de ce corps dans la Biochimie de la vision à la lumière des connaissances actuelles des photopigments de la rétine.

Dans la SECONDE PARTIE, la réduction du corps "Y" nous permet de démontrer la structure de l'époxyde de vitamine A₁ et de son isomère furannique, puis d'étudier l'activité biologique de l'époxyde de vitamine A₁ chez le rat blanc carencé.

PREMIERE PARTIE

PREPARATION DE L'EPOXYDE 5-6 DU RETINENE₁ OU CORPS "Y"
PAR OXYDATION PERMANGANIQUE DE LA VITAMINE A₁

L'oxydation permanganique de la vitamine A₁ utilisée par Morton et Goodwin (42) pour la préparation du rétinène₁ ou aldéhyde de la vitamine A₁ donnait naissance à deux corps :

- le rétinène₁ absorbant dans le chloroforme à 389 m μ et dans le trichlorure d'antimoine à 664 m μ , avec un rendement très faible mais prouvant que le rétinène₁ est un dérivé d'oxydation de la vitamine A₁.
- un composé non identifié par ces auteurs, absorbant à 345 m μ dans le chloroforme et 560 m μ dans SbCl₃.

Meunier et Jouanneteau (34) oxydant par le permanganate de potasse en milieu sulfurique un concentré de vitamine A₁ ont pu isoler ce corps à l'aide du réactif T de Girard et Sandulesco (12). Nous avons utilisé par la suite la même méthode (36) partant soit de concentré de vitamine A₁, soit de vitamine A₁ cristallisée naturelle.

1 g de vitamine A₁ est dissous dans 100 cm³ d'éther de pétrole léger (Ebull. 40-50°). La solution, mise dans une ampoule à décantation, est additionnée de 200 cm³ d'acide sulfurique à 5 % et 300 cm³ de permanganate de potasse N/10. Après une agitation vigoureuse de 3 à 4 minutes, on laisse reposer 10 minutes environ en protégeant l'ampoule de la lumière par un écran noir. On observe une décoloration du permanganate complète en quelques minutes et une pellicule brune apparaît au niveau de séparation des phases aqueuse et éthéropétrolique.

On décante la couche aqueuse et la solution éthérée est lavée jusqu'à neutralité au papier de tournesol avec de l'eau distillée (environ 3 fois 20 cm³). L'éther de pétrole est alors recueilli et séché sur SO₄Na₂ anhydre qui retient la pellicule brune formée pendant l'oxydation. On filtre, rince SO₄Na₂ et le filtre deux fois avec 10 cm³ d'éther de pétrole. La solution éthérée et les liquides de lavage réunis sont distillés sous vide et les dernières traces de solvant éliminées par un courant d'azote. On obtient ainsi 500 mg d'un corps jaunâtre huileux (corps "Y" brut) qui, conservé en couche mince à la glacière ou dans le vide sur P₂O₅, présente en quelques heures des cristaux fondant à + 5° environ, de sorte qu'ils n'ont pu être isolés.

Le corps "Y" brut est alors purifié par le réactif T de Girard et Sandulesco. Le corps mis en solution dans 15 cm³ d'alcool absolu est additionné de 1 cm³ d'acide acétique cristallisable et 0,50 g. de réactif T. On porte 40 minutes à l'ébullition à reflux. On sature ensuite par la soude les 9/10 de l'acide acétique et on complète à 50 cm³ par de l'eau distillée glacée. On constate la formation d'un abondant trouble jaune. Lorsque l'on agite cette solution aqueuse avec de l'éther sulfurique sans peroxydes, celui-ci se colore en jaune et l'on continue l'extraction jusqu'à ce que l'éther demeure incolore. Par évaporation, cette phase étherée, dite "éther non cétonique", laisse un résidu jaune qui, examiné au spectrophotomètre de Beckman, se montre formé de corps n'ayant pas réagi avec le réactif T : vitamine A₁ non oxydée et vitamine A₁ cyclisée (bandes à 330, 350, 370 et 390 mμ environ).

La phase aqueuse dite "cétonique" contient, ainsi que l'ont montré Meunier et Jouanneteau (34), le corps "Y" à l'état d'hydrazide de T soluble dans l'eau et dissociable par SO₄H₂ concentré ajouté dans la proportion de 5 cm³ pour 100 cm³ de solution aqueuse. La phase aqueuse cétonique, clarifiée par les extractions étherées précédentes, est donc traitée par 2,5 cm³ de SO₄H₂ concentré. On note l'apparition d'une coloration rouge mauve et d'un trouble qui augmente pendant 10 minutes environ. Après ce temps, on agite avec l'éther sulfurique sans peroxydes qui se colore en jaune et l'on continue l'extraction jusqu'à ce que le solvant soit incolore. Les extraits étherés réunis ("éther cétonique") sont lavés à l'eau distillée jusqu'à neutralité au papier de tournesol. L'éther séché sur SO₄ Na₂ anhydre est distillé dans le vide puis sous un courant d'azote. On obtient un produit jaune, huileux, pesant 250 mg. C'est l'époxyde - 5-6 du rétinène₁ pur ou corps "Y" absorbant à :

- 345 mμ dans le chloroforme
 - 340 mμ dans le cyclohexane
 - 342 mμ dans l'alcool
 - 330 mμ dans l'éther de pétrole et l'éther sulfurique
 - 560 mμ dans le trichlorure d'antimoine
(réactif de Carr-Price)
-

PREPARATION DE L'EPOXYDE DE RETINENE₁ PAR OXYDATION

PERMANGANIQUE DU RETINENE₁

Préparation du rétinène₁ .

Le rendement dans la production du rétinène₁ par oxydation de l'axérophтол est plus important si l'on utilise la méthode au bioxyde de manganèse de Ball, Goodwin et Morton (1 a,b), au lieu de la méthode d'oxydation permanganique de Morton et Goodwin (42). Selon ces auteurs (1), la production de rétinène₁ par oxydation permanganique de la vitamine A₁ se fait avec un rendement très faible et l'expérience n'est pas très facilement reproductible. Ils remarquèrent cependant que le rendement est meilleur lorsqu'il y a, au cours de la réaction, formation de bioxyde de manganèse hydraté, ce qui a lieu lorsque la quantité de SO₄H₂ employée est insuffisante pour donner une solution claire. Ils prêtèrent alors attention au fait qu'un échantillon de vitamine A₁ laissé en contact avec du bioxyde de manganèse donne une bande à 664 mμ dans SbCl₃. Ils essayèrent le bioxyde de manganèse comme oxydant de la fonction alcool primaire de l'axérophтол. Cette réaction d'oxydation est spécifique et se réalise en trois temps :

- adsorption de la vitamine A₁ en solution dans l'éther de pétrole sur MnO₂ .
- oxydation de -CH₂OH en -CHO
- passage du rétinène₁ formé dans l'éther de pétrole.

Nous avons préparé du rétinène₁ selon cette méthode avec 0,200 g de vitamine A₁ dissous dans 100 cm³ d'éther de pétrole et 5 g de MnO₂ électrolytique. Le mélange est agité et laissé à l'obscurité à la température du laboratoire pendant 5 jours en agitant de temps en temps. Après ce temps, l'éther de pétrole est décanté et MnO₂ lavé une fois avec ce solvant. Les solutions éthéro-pétroliques réunies sont additionnées de 10 % de benzène et chromatographiées sur alumine Prolabo.

Préparation de l'époxyde de rétinène₁ .

10 mg de rétinène₁ ainsi préparé présentant un spectre d'absorption à bande unique (courbe I, fig. 1) sont dissous dans 5 cm³ d'éther de pétrole. On agite dans une ampoule à décantation la solution éthérée avec un mélange de 5 cm³ d'acide sulfurique à 5 % et 7,5 cm³ de MnO₄K N/10 pendant 3 à 4 minutes.

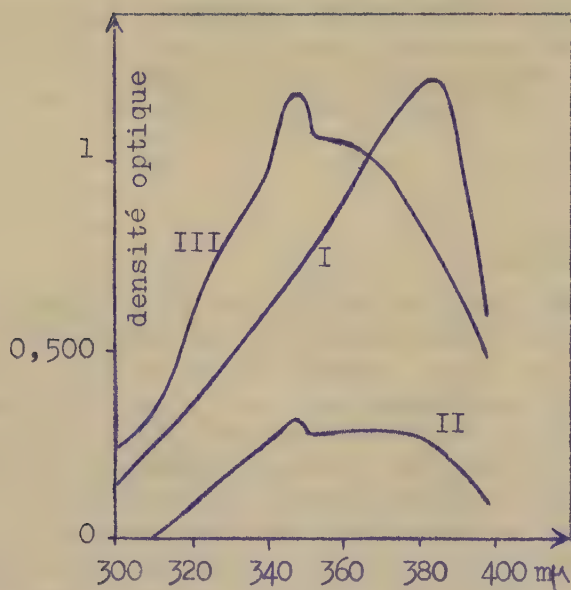


Figure I

Spectres d'absorption du rétinène₁ dans le chloroforme avant (courbe I) et après (courbes II et III) oxydation par MnO_4K .

Après 10 minutes de repos, on sépare et on lave à l'eau distillée la couche étherée jusqu'à neutralité au papier de tournesol. L'éther de pétrole est séché sur SO_4Na_2 anhydre et filtré. On rince SO_4Na_2 et le filtre avec un peu d'éther de pétrole. Les solutions étherées réunies sont distillées sous vide fournissant un résidu jaune présentant dans le chloroforme une bosse à 345 mm et 389 mm (fig. 1, courbe II).

On reprend alors l'oxydation permanganique : action de 2 cm³ de SO_4H_2 à 5 % et 3 cm³ de MnO_4K N/10 sur le produit mis en solution dans 5 cm³ d'éther de pétrole en agitant mécaniquement pendant 1 h. 1/2. L'éther de pétrole est recueilli, lavé et séché. Le résidu de distillation présente alors une bande unique à 345 mm dans le chloroforme (fig. 1, courbe III) et 560 mm dans SbCl_3 .

PREPARATION DE L'EPOXYDE 5-6 DU RETINENE₁ OU CORPS "Y"
PAR ACTION DU BIOXYDE DE MANGANESE SUR LA VITAMINE A₁

Nous avons montré que l'oxydation du rétinène₁ par MnO₄K en milieu sulfurique conduit à l'époxyde de rétinène₁ et nous avons pensé que l'oxydation de l'axérophtol par MnO₂ (selon 1) pourrait se faire non plus seulement avec formation de rétinène₁ mais aussi de corps "Y" dans certaines conditions.

Nous apportons deux types d'expériences d'oxydation de l'axérophtol par MnO₂ (39).

1ère expérience :

A 400 mg de vitamine A₁ alcool cristallisée (*) dissous dans 200 cm³ d'éther de pétrole léger (Ebull. 40-50°), nous avons ajouté 100 g de MnO₂ électrolytique (**), soit 250 fois le poids d'axérophtol mis en oeuvre. Le bioxyde de manganèse présentait une surface de 10 m² au gramme (***) et un pH de 7,5 déterminé après agitation de 30 g de MnO₂ dans 15 cm³ d'eau.

Après une agitation lente de 20 minutes, l'éther de pétrole décanté ne présente aucune absorption dans l'Ultra-Violet. Le bioxyde de manganèse est alors lavé au chloroforme jusqu'à ce que le solvant soit incolore. Par distillation sous vide du chloroforme, on recueille un résidu jaune présentant les caractères spectraux du corps "Y": 345 mμ dans le chloroforme, 560 mμ dans SbCl₃. Ce résidu mis en solution dans 200 cm³ d'éther de pétrole contenant 10 % de benzène déthiophéné est chromatographié sur une colonne d'alumine Prolabo. Le chromatogramme ne fournit aucune séparation de corps étrangers.

(*) Nous remercions vivement ici Monsieur James G. Baxter, de la Distillation Products de Rochester (U.S.A.), pour ses gracieux envois de concentré de vitamine A.

(**) Aimablement fourni par la Société d'Importation et Traitement des Minerais (Paris).

(***) Nous remercions ici M. Teichner, du Laboratoire de M. le Professeur Prettre, qui a aimablement effectué pour nous la mesure des surfaces spécifiques des échantillons de MnO₂ selon Burnauer, Emmet et Tiller (7).

2ème expérience :

Une autre expérience portait sur 1 g de concentré de distillation moléculaire d'huile de foie de thon rouge ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ à 328 m μ = 1000) (contenant 630 mg de vitamine A₁ alcool) en solution dans 200 cm³ d'éther de pétrole. On ajoutait 200 g de MnO₂ présentant les mêmes caractéristiques que précédemment, soit plus de 310 fois le poids d'axérophtol. Après 6 minutes d'agitation lente, on décante l'éther de pétrole n'absorbant plus dans l'U.V. et MnO₂ est lavé avec du chloroforme. Le chloroforme distillé sous vide laisse un résidu huileux jaune à 2 maxima d'absorption dans le chloroforme:

- une bande principale à 345 m μ (fig. 2)
- une bande secondaire à 285 m μ

Ce mélange dissous dans 200 cm³ d'éther de pétrole contenant 10 % de benzène est chromatographié sur une colonne d'alumine Prolabo de 20 cm de hauteur sur 2 cm de diamètre. Le chromatogramme présente 2 zones :

- a) une zone supérieure jaune de 2 cm de hauteur dont, après élution à CHCl₃, le maximum d'absorption est à :
 - 285 m μ dans CHCl₃ (fig. 2)
 - 282 m μ dans l'alcool
 - 273 m μ dans l'éther de pétrole
 - 480 m μ dans SbCl₃
- b) une zone inférieure de 9 cm de hauteur uniquement composée de l'époxyde de rétinène₁, ainsi que le montre l'examen au spectrophotomètre de Beckman après élution à CHCl₃ (fig.2)

En résumé, le bioxyde de manganèse, ainsi que l'a montré Morton, se conduit vis à vis de l'axérophtol comme un agent oxydant équivalent au permanganate acide. Nous venons de voir que lorsque l'on augmente la quantité de MnO₂ mise en jeu, il y a production d'époxyde de rétinène₁ par oxydation de la double liaison cyclique et cette production est maximum lorsque le corps est totalement adsorbé sur MnO₂.

Selon Wald (57), les procédés d'oxydation de la vitamine A₁ par le bioxyde de manganèse relèvent d'une réaction chromatographique hautement orienté dans laquelle MnO₂ est à la fois adsorbant et réactif. Les molécules seraient attachées au bioxyde de manganèse par un ou plusieurs points spécifiques grâce auxquels la réaction a lieu. Dans ces expériences d'oxydation de la vitamine A₁, nous pouvons admettre qu'elle est adsorbée sur MnO₂ puis oxydée en rétinène₁, lui-même oxydé en époxyde-5-6 de rétinène₁ restant adsorbé sur MnO₂.

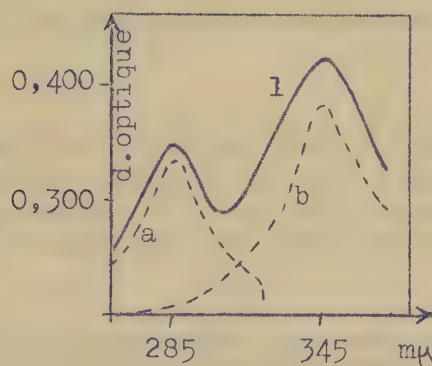


Figure 2

- 1 : spectre d'absorption du produit brut obtenu par action de MnO_2 sur l'axérophthol avant chromatographie dans CHCl_3 (1mg dans 100 cm^3).
- a : spectre d'absorption de la zone supérieure du chromatogramme dans CHCl_3 : 285 $\text{m}\mu$ (0,7 mg dans 100 cm^3).
- b : spectre d'absorption de la zone inférieure du chromatogramme dans CHCl_3 : 345 $\text{m}\mu$ (1 mg dans 100 cm^3).

PREPARATION DE L'EPOXYDE-5-6 DU RETINENE₁ OU CORPS "Y"

PAR COUPURE OXYDANTE DU β -CAROTENE PAR MnO_2

En 1945, Hunter et Williams (21) réalisèrent l'oxydation du β -carotène en rétinène₁ par le perhydrol en milieu acétique. En 1950, Wendler, Rosenblum et Tishler (63) obtinrent les mêmes résultats avec le perhydrol en présence de tétr oxyde d'osmium mais avec un meilleur rendement.

Meunier, Jouanneteau et Zwingelstein (38) utilisant MnO_2 comme catalyseur dans l'oxydation du β -carotène obtinrent directement le rétinène₁. L'action du bioxyde de manganèse sur l'axérophthol, montrée par Ball, Goodwin et Morton (1b), n'avait pas été essayée sur le β -carotène par ces auteurs.

La technique utilisée par Meunier et Coll. (38) est la suivante :

100 mg de β -carotène brut cristallisé (extrait de l'huile de palme d'A.O.F.) sont dissous dans 100 cm³ d'éther anhydre mélangé à 3 cm³ d'alcool absolu. La solution additionnée de 10 g de MnO_2 électrolytique à grain très fin (présentant par exemple 10 m² de surface au gramme) soit 100 fois le poids du carotène, est agitée en présence d'air et à l'abri de la lumière. L'oxydation s'accompagne d'une décoloration de la phase étherée qui passe du rouge au jaune clair en 5 à 10 minutes, selon la température ambiante. On élimine alors MnO_2 par filtration et le filtrat dilué dans l'alcool absolu présente un maximum d'absorption à 385 m μ et à 664 m μ dans le réactif au $SbCl_3$. L'éther séché sur SO_4Na_2 anhydre est évaporé sous vide. Le résidu obtenu, chromatographié sur alumine, donne un chromatogramme à deux zones absorbant respectivement dans l'alcool à 335 et 385 m μ . Le corps absorbant à 335 m μ n'est autre que l'hydrate de rétinène₁ (37). Le rendement en rétinène₁ obtenu par cette méthode est d'environ 50 % du β -carotène mis en oeuvre.

Nous avons recherché (39) s'il était possible d'obtenir l'époxyde-5-6 du rétinène₁ dans la coupure oxydante du β -carotène par MnO_2 , concurremment au rétinène₁. Dans les divers essais effectués, nous avons constaté que la réaction est fortement influencée par le bioxyde de manganèse utilisé. Voici deux expériences pratiquées avec deux échantillons différents de MnO_2 .

On prépare deux solutions de 250 mg de β -carotène cristallisé (P.F. 184°, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ à 460 m μ dans $CHCl_3$ = 2.200) dans 125 cm³ de benzène déthiophéné. Ces solutions étant maintenues à la température du laboratoire, on ajoute à la première 25 g de MnO_2 électrolytique de 14 m² de surface au gramme et pH 6, et à la seconde 25 g de MnO_2 électrolytique de 10 m² de surface et pH 7,5. Dans les deux

cas, on met en jeu 100 fois le poids de β -carotène en MnO_2 .

Si l'on suit l'absorption dans l'U.V. du benzène surnageant MnO_2 on constate que, dans le cas du MnO_2 à 14 m² de surface au gramme et pH 6, la coupure du β -carotène est complète après 5 minutes d'agitation lente tandis qu'il faut 8 minutes avec l'échantillon de MnO_2 de 10 m² de surface au gramme et pH 7,5.

Dans les deux cas, on observe au cours de la réaction l'apparition de la bande du rétinène₁, puis de l'époxyde de rétinène₁ (fig. 3).

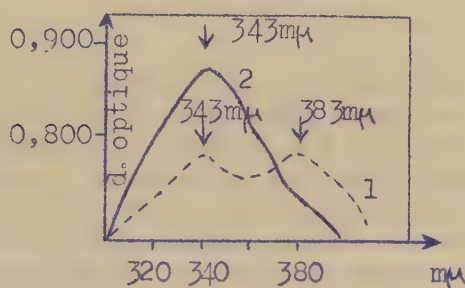


Figure 3

Spectres du produit de coupure du β -carotène par MnO_2 (0,5 mg dans 100 cm³ d'alcool).

- 1 : après 5 minutes de contact (343 et 383 m μ).
- 2 : après 8 minutes de contact (343 m μ).

Lorsqu'après disparition de la bande du β -carotène, on continue l'agitation, l'époxyde de rétinène₁ devient prédominant mais il subsiste un peu de rétinène₁. On sépare par filtration MnO_2 que l'on rince deux fois avec environ 20 cm³ de benzène.

Cependant lorsque l'on opère avec un solvant non polaire, c'est-à-dire sans effet éluant appréciable, ce qui est le cas du benzène, la plus grande partie de l'époxyde de rétinène₁ reste adsorbée sur MnO_2 . En effet, l'élution de MnO_2 par CHCl_3 jusqu'à ce que ce solvant demeure incolore, fournit après distillation dans le vide un résidu jaune, huileux dont le maximum principal est à 345 m μ dans CHCl_3 , 330 m μ dans l'éther de pétrole, 560 m μ dans SbCl_3 (époxyde de rétinène₁). 50 mg de ce résidu, dissous dans 100 cm³ d'éther de pétrole contenant 10 % de benzène, sont chromatographiés sur une colonne d'alumine Prolabo de 20 cm de hauteur et 2 cm de diamètre. Le chromatogramme présente 3 zones que l'on sépare et élue par l'éther

sulfurique sans peroxydes :

- une zone supérieure de 1 cm de hauteur, jaune orangé , dont le maximum d'absorption est à 285 m μ dans CHCl₃ et 540 m μ dans SbCl₃ .
- une zone intermédiaire jaune, de 5 cm de hauteur, dont les caractéristiques spectrales sont celles de l'époxyde du rétinène₁ .
- une zone inférieure rouge, de 2 cm de hauteur, dont le maximum d'absorption est à 390 m μ dans CHCl₃ et 664 m μ dans SbCl₃ (rétinène₁).

Comme en ce qui concerne la vitamine A₁ , on peut admettre pour la coupure oxydante du β -carotène en rétinène₁ et en époxyde de rétinène₁ l'hypothèse de Wald (57). MnO₂ agit comme adsorbant en fixant la molécule de β -carotène par sa double liaison centrale puis comme oxydant par fission de la molécule en son milieu et fixation d'oxygène. Nous avons suivi cette réaction et constaté que le rétinène₁ formé d'abord est oxydé ensuite en époxyde de rétinène₁ (fig.3) ce corps restant en grande partie adsorbé sur MnO₂ lorsqu'on opère dans un solvant non polaire, tel le benzène.

PREPARATION DE LA 2-4-DINITROPHENYLHYDRAZONE DE

L'EPOXYDE-5-6 DU RETINENE₁

Après la mise en évidence par Meunier et Jouanneteau (34) d'un carbonyle dans la molécule de corps "Y" susceptible de fournir un hydrazide T, nous avons préparé une 2-4-dinitrophénylhydrazone cristallisée nous permettant de confirmer par ses caractères spectraux et le point de fusion l'identité des échantillons d'époxyde de rétinène₁ préparé par les trois procédés exposés.

Le réactif à la 2-4-dinitrophénylhydrazine utilisé est un réactif alcoolique (45) préparé de la manière suivante : dans un petit mortier on mélange intimement 1 g de 2-4-dinitrophénylhydrazine et 2 cm³ de SO₄H₂ concentré. On ajoute peu à peu et en agitant 15cm³ d'alcool absolu bouillant. Après dissolution complète, on remplace l'alcool évaporé. Ce réactif se prend en masse par refroidissement ; on l'utilise après chauffage au bain-marie bouillant jusqu'à limpidité parfaite.

PREPARATION A PARTIR DE CORPS "Y" OBTENU
PAR OXYDATION PERMANGANIQUE ACIDE DE LA VITAMINE A₁ (36)

120 mg de corps "Y" pur fraîchement préparé à l'aide du réactif T de Girard et Sandulesco sont dissous dans 2 cm³ d'alcool absolu. A la solution légèrement chauffée, on ajoute en agitant 1,9 cm³ de réactif à la 2-4-dinitrophénylhydrazine préalablement clarifié par chauffage. On observe immédiatement la formation d'un précipité brun rouge abondant de 2-4-dinitrophénylhydrazone amorphe. La cristallisation est très difficile. On procède à de nombreuses dissolutions dans l'alcool bouillant et recristallisations successives. On obtient finalement 59 mg de cristaux brun rouge légèrement brillants fondant à 160° (P.F. non corrigé). Une solution à 1,2 mg pour 100 cm³ de chloroforme présente dans l'U.V. un maximum principal à 417 mμ et un maximum secondaire à 340 mμ (fig. 4)

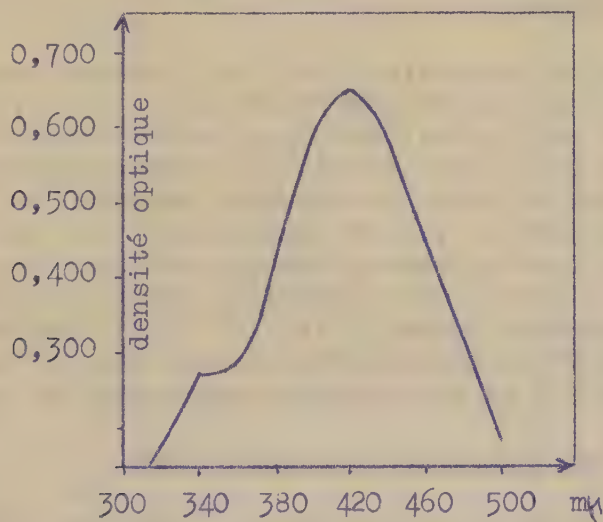


Figure 4

Spectre d'absorption lumineuse des cristaux de 2-4-dinitrophénylhydrazone du corps "Y" dans le chloroforme - (solution à 1,2mg dans 100 cm³).

PREPARATION A PARTIR DE CORPS "Y" OBTENU
PAR OXYDATION DE L'AXEROPHTOL PAR MnO₂ (39)

L'oxydation de la vitamine A₁ par MnO₂ fournit par élution de celui-ci au chloroforme un mélange de 2 corps absorbant à :

- 285 mμ dans CHCl₃
- 480 mμ dans SbCl₃
- et - 345 mμ dans CHCl₃
- 560 mμ dans SbCl₃

ce dernier étant l'époxyde-5-6 du rétinène₁ que l'on sépare par chromatographie sur alumine.

A 200 mg de corps ainsi purifié, dissous dans 5 cm³ d'alcool absolu, on ajoute 2,4 cm³ de réactif à la 2-4-D. Le précipité amorphe, recueilli par centrifugation et séché sous vide, présente un point de fusion de 125°. Pour éviter des passages trop nombreux dans l'alcool, on dissout le précipité amorphe dans 100 cm³ de benzène déthiophéné et on le purifie par chromatographie sur une colonne d'alumine Prolabo. Le chromatogramme présente une zone unique brun foncé que l'on élue par l'éther sans peroxydes. Après distillation sous vide de l'éther, le résidu obtenu (P.F. 145°) est encore purifié par 3 dissolutions et cristallisations successives dans l'alcool. On recueille finalement 125 mg de cristaux identiques aux précédents :

- Point de fusion non corrigé : 160°
 - Point de fusion après mélange avec des cristaux préparés à partir du corps "Y" obtenu par oxydation permanganique : 160°
 - Maximum d'absorption dans l'U.V. : 417 mμ dans le chloroforme.
-

PREPARATION A PARTIR DU CORPS "Y" OBTENU
PAR COUPURE OXYDANTE DU β -CAROTENE PAR MnO_2

La coupure oxydante, dans les conditions que nous avons exposées (39), laisse adsorbé sur MnO_2 un mélange de 3 corps absorbant respectivement à :

- | | | | | |
|---------------|---------------|----|-------------|-----------------|
| - 285 m μ | dans $CHCl_3$ | et | 480 m μ | dans $SbCl_3$ |
| - 390 m μ | - | - | et | 664 m μ - - |
| - 345 m μ | - | - | et | 560 m μ - - |

200 mg de ce mélange dissous dans 5 cm³ d'alcool absolu sont traités par 2,4 cm³ de réactif à la 2-4-D. Le précipité amorphe brun est recueilli par centrifugation et séché sous vide. Un examen spectrophotométrique au Beckman indique 2 maxima principaux dans le chloroforme: 417 m μ (2-4-dinitrophénylhydrazone de "Y"), 442 m μ (2-4-dinitrophénylhydrazone de rétinène₁) (fig. 5).

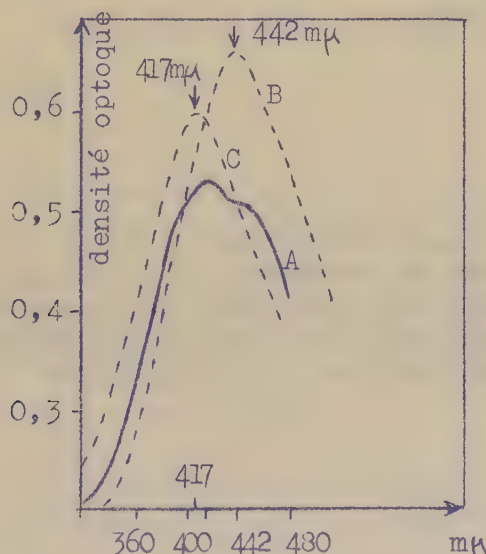


Figure 5

Spectres d'absorption de la 2-4-dinitrophénylhydrazone du produit de coupure du β -carotène par MnO_2 dans $CHCl_3$.

- A : avant chromatographie à la concentration de 1 mg dans 100 cm³ de $CHCl_3$ (417 et 442 m μ).
- B : de la zone b du chromatogramme à la concentration de 0,7 mg dans 100 cm³ de $CHCl_3$ (442 m μ).
- C : de la zone c du chromatogramme à la concentration de 1,5 mg dans 100 cm³ de $CHCl_3$ (417 m μ).

Les 300 mg de produit amorphe dissous dans 150 cm³ de benzène sont chromatographiés sur alumine Prolabo (colonne de 20 cm de hauteur sur 2 cm de diamètre). Le chromatogramme est à 3 zones que l'on élue par l'éther sulfurique sans peroxydes :

- a) une zone supérieure brun foncé de 1 cm de hauteur (poids 41 mg) absorbant à 395 m μ dans le chloroforme, correspondant à un mélange de corps indéterminés.
- b) une zone intermédiaire brun rouge de 6 cm de hauteur (poids 92 mg) absorbant à 442 m μ dans CHCl₃, (2-4-D du rétinène₁) (fig. 5).
- c) une zone inférieure jaune orangé de 10 cm de hauteur (poids 147 mg) absorbant à 417 m μ dans CHCl₃. C'est la 2-4-dinitrophénylhydrazone de l'époxyde-5-6 de rétinène₁. Après recristallisations dans l'alcool les cristaux obtenus sont identiques à ceux des 2 préparations précédentes :

- maximum d'absorption dans CHCl₃ : 417 m μ (fig. 5)
- point de fusion (non corrigé) : 160°. Le point de fusion n'est pas abaissé après mélange de ces cristaux avec ceux obtenus après oxydation de l'axérophtol par le permanganate acide ou MnO₂.

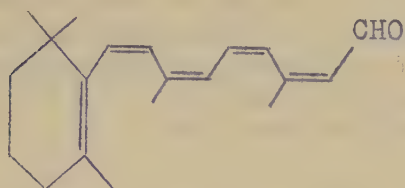
Remarque :

Le corps "Y" peut être régénéré de sa 2-4-dinitrophénylhydrazone selon la méthode de Hershberg (17). 25 mg de 2-4-D sont dissout dans 10 cm³ d'acide acétique glacial. On ajoute 7 mg de pyruvate de sodium dissous dans 2 cm³ d'eau distillée. Après 2 h. d'ébullition à reflux, on laisse refroidir et le corps "Y" est extrait par CHCl₃.

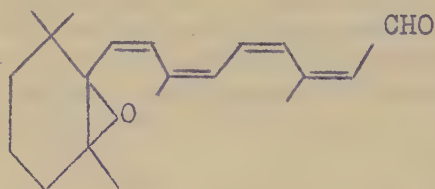
CONSTITUTION CHIMIQUE DE L'EPOXYDE-5-6 DU RETINENE₁

OU CORPS "Y"

Dès 1948, P. Meunier (34) assignait au corps absorbant à 345 mμ dans le chloroforme et 560 mμ dans SbCl₃ (corps "Y") la structure de l'époxyde-5-6 du rétinène₁, le rétinène₁ ayant été identifié par Morton et Goodwin en 1944 (42) à l'aldéhyde de la vitamine A₁



rétinène₁



époxyde-5-6 du rétinène₁

389 mμ dans le chloroforme

664 mμ dans SbCl₃

345 mμ dans le chloroforme

560 mμ dans SbCl₃

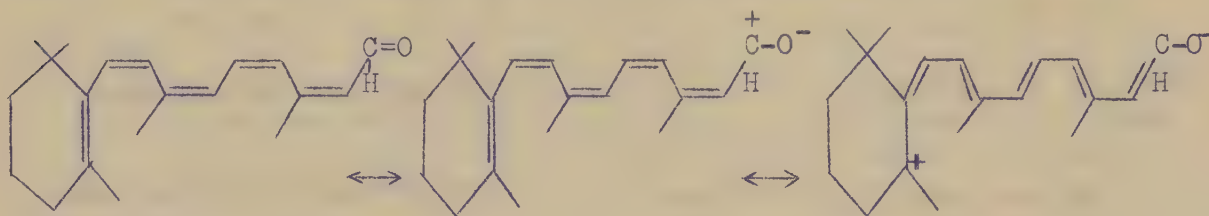
Nous avons démontré l'exactitude de cette formule en 1949 (P. Meunier, R. Mallein, J. Jouanneteau) (36).

Si l'on détermine le maximum d'absorption dans l'ultra-violet au spectrophotomètre de Beckman du corps "Y" dans divers solvants, on note un déplacement de la bande comparable à celui observé pour le rétinène₁. Dans le tableau suivant sont rassemblés les résultats obtenus pour ces deux corps.

solvant	rétinène ₁ (lb)	corps "Y"	Indices de réfraction n _D
chloroforme	389 mμ	345 mμ	1,44563 à 20°
alcool	385,5 mμ	342 mμ	1,3595 à 25°
éther de pétrole	369,5 mμ	330 mμ	
éther sulfurique	369,5 mμ	330 mμ	1,3497 à 24°8
cyclohexane	373 mμ	340 mμ	1,4262 à 20°

Selon la règle de Kundt, les spectres d'absorption des substances en solution se déplacent vers les plus grandes longueurs d'ondes avec l'accroissement de l'indice de réfraction du solvant. Pour les caroténoïdes, le spectre se déplacerait peu ou pas du tout lorsque le corps est transféré de l'hexane ou de l'éther de pétrole à l'éthanol qui a un indice de réfraction presque égal, mais on observe un grand déplacement (9 à 15 $m\mu$) avec un solvant beaucoup plus réfringent comme le chloroforme. Wald (57) avait remarqué que la vitamine A₁ et la vitamine A₂ se conduisent de cette manière tandis que les rétinènes correspondants présentent un type de comportement très différent. On observe avec eux un déplacement anormal du spectre entre hexane et chloroforme (environ 20 $m\mu$) et le spectre dans l'éthanol se rapproche de celui dans le chloroforme.

Le rétinène₁ possède un carbonyle conjugué. Ce radical est hautement polaire et la charge positive de l'atome de carbone tend à être transmise le long de la chaîne polyénique. De tels composés polyéniques, à carbonyle conjugué, existent donc comme hybrides de résonnance d'arrangements structuraux alternatifs. Dans le cas du rétinène₁, les stades limites peuvent être représentés ainsi :



Ces hybrides de résonnances montrent un déplacement du spectre d'absorption vers le rouge. Alors que l'addition d'un groupement éthylène ordinaire ($-CH=CH-$) à une chaîne polyénique déplace le spectre d'environ 20 à 25 $m\mu$ vers le rouge, l'addition d'un carbonyle conjugué le déplace de 30 à 40 $m\mu$. Ainsi on trouve un déplacement de 40 $m\mu$ dans l'hexane pour le rétinène₁, comparé avec la vitamine A₁. Cet effet du carbonyle est exagéré dans les solvants qui sont eux-mêmes polaires dans lesquels on trouve, superposé aux changements spectraux qui vont avec l'indice de réfraction du solvant, un effet spécial corrélatif avec le moment dipôle du solvant. Tandis que hexane et éthanol sont identiques du point de vue indice de réfraction, dans le moment dipôle, l'éthanol se rapproche du chloroforme et diffère largement de l'hexane ou du pentane homopolaire. Pour Wald, ce type de comportement dans lequel le déplacement du spectre entre hexane et chloroforme est anormalement grand et où le spectre dans l'éthanol tend à se rapprocher de celui dans le chloroforme est la preuve de la présence d'un carbonyle conjugué dans un caroténoïde.

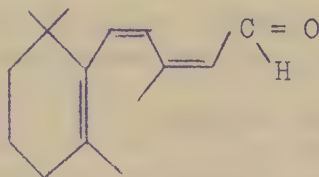
C'est ce que nous avons pu observer en ce qui concerne le corps "Y". L'exemple est particulièrement net si l'on considère les spectres d'absorption dans :

l'éther de pétrole.....	: 330 $m\mu$
l'alcool	: 342 $m\mu$
le chloroforme	: 345 $m\mu$

on note un déplacement de 12 m μ entre éther de pétrole et alcool tandis qu'il y a seulement une différence de 3 m μ entre alcool et chloroforme.

Le comportement spectral du corps "Y" indique donc la présence d'un carbonyle conjugué. On sait que le rétinène₁ est l'aldéhyde de la vitamine A₁ et d'autre part, nous avons rapporté l'obtention du corps "Y" par oxydation du rétinène₁ par le permanganate acide, ainsi que dans l'oxydation de la vitamine A₁ par MnO₂ et la coupure oxydante du β -carotène par MnO₂. Le corps "Y" est par conséquent un aldéhyde.

Mais son maximum d'absorption dans l'U.V. à 345 m μ dans le chloroforme montre la présence de 5 doubles liaisons conjuguées au lieu des 6 doubles liaisons conjuguées du rétinène₁ (390 m μ dans CHCl₃). En effet, D.H. van Dorp et J.F. Arens (9) ont préparé par synthèse un corps signalé par Hunter et Hawkins (20) qui n'est autre que le β -ionylidène-acétaldéhyde :



Ce corps possédant 4 doubles liaisons conjuguées dont une appartenant à la fonction aldéhydique absorbe à 308 m μ dans l'isooctane et 310 m μ dans le cyclohexane. Le rétinène₁ possédant 6 doubles liaisons conjuguées dont une aldéhydique absorbe à 374 m μ dans l'isooctane et 376 m μ dans le cyclohexane. Il y a donc entre ces deux aldéhydes une différence de 66 m μ dans le cyclohexane pour 2 doubles liaisons conjuguées. Or le corps "Y", aldéhyde lui aussi, absorbe à 340 m μ dans le cyclohexane, ce qui correspond à 5 doubles liaisons conjuguées, c'est-à-dire une de moins que la molécule de rétinène₁.

La fonction aldéhydique du corps "Y" permet l'obtention d'un hydrazide T soluble dans l'eau et d'une 2-4-dinitrophénylhydrazone cristallisée.

La combinaison facile du corps "Y" avec le réactif T, ainsi que sa régénération par SO₄H₂ sont en contradiction avec les données de Girard et Sandulesco (12). De nombreux aldéhydes peuvent facilement être régénérés de leurs combinaisons hydraziniques aussi bien que les cétones et nous l'avons vérifié pour l'aldéhyde benzoïque, l'aldéhyde cinnamique et le citral. (constaté aussi par Lederer (28).

D'autre part, nous avons vu que la 2-4-dinitrophénylhydrazone cristallisée, qu'elle soit préparée à partir de corps "Y", obtenue par oxydation de l'axérophтол par MnO₄K ou MnO₂, ou par coupure oxydante du β -carotène par MnO₂ est la même. Ces caractéristiques: point de fusion 160°, spectre dans le chloroforme à 2 maxima : un maximum principal à 417 m μ , un maximum secondaire à 340 m μ (fig.4), sont à rapprocher de celles de la 2-4-dinitrophénylhydrazone du

rétinène₁, selon Ball, Goodwin et Morton (1b) : point de fusion 206-207°, spectre d'absorption dans le chloroforme à maximum principal à 442 mμ et maximum secondaire à 360 mμ.

L'analyse élémentaire effectuée sur des cristaux de 2-4-dinitrophénylhydrazone du corps "Y" a fourni les résultats suivants :

C : 62,31 % H : 6,53 % N : 11,78 %

Les résultats calculés pour C₂₆H₃₄O₆N₄ sont :

C : 62,65 % H : 6,82 % N : 11,24 %

Par conséquent, le corps "Y" est bien le dihydroxy 5-6-rétinène₁. C'est la double liaison cyclique qui a disparu par fixation de 2 oxydriles.

Cependant divers essais pratiqués sur ce corps nous ont permis de constater qu'il peut exister sous deux formes :

- époxyde-5-6 de rétinène₁
- dihydroxy-5-6-rétinène₁

En effet, si l'on agite 5 cm³ d'une solution éthéro-pétrolique de corps "Y" pur, venant d'être préparé, avec 5 cm³ d'alcool méthylique à 90 %, on constate, après repos, que la couche méthanolique est plus colorée que la couche éthéro-pétrolique. Cet essai de partage, dans lequel la presque totalité du corps passe en solution dans le méthanol à 90 %, serait, selon Wald (48), grossièrement spécifique des dihydroxycaroténoïdes. Ce phénomène avait déjà été observé pour la xanthophylle estérifiée qui passe en totalité dans le benzène dans les mêmes conditions tandis qu'après 3 h. de saponification à la température du laboratoire avec 6 % de potasse alcoolique, cette répartition est renversée et la xanthophylle libre passe en totalité dans le méthanol à 90 % (26 et 27).

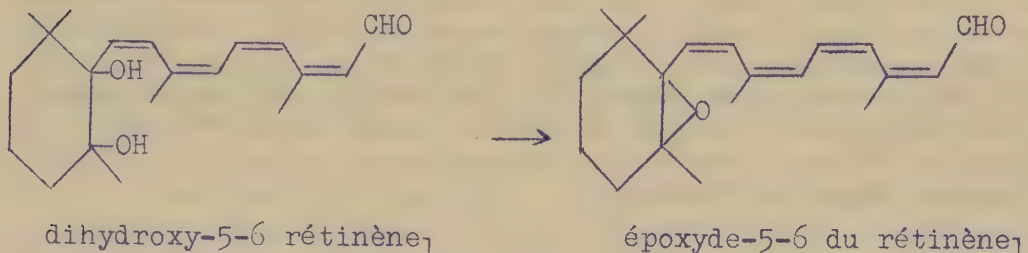
Nous avons vérifié la présence de 2 oxydriles dans la molécule de corps "Y" fraîchement préparé par la recherche des hydrogènes mobiles d'après Tschugaeff et Zéréwétinoff (11).

Le solvant utilisé était l'oxyde de butyle normal, desséché sur sodium puis distillé sur sodium. Ce solvant anhydre servait aussi à préparer le réactif de Grignard à l'iodure de méthyl-magnésium que l'on conservait en ampoules scellées. Pour chaque dosage, un essai à blanc était effectué avec 1 cm³ d'oxyde de butyle et 0,5 cm³ de réactif de Grignard. D'autre part, un essai témoin était pratiqué avec du cholestérol pur, conservé dans le vide sur P₂O₅, et pour lequel nous avons toujours trouvé le pourcentage théorique d'hydrogène mobile.

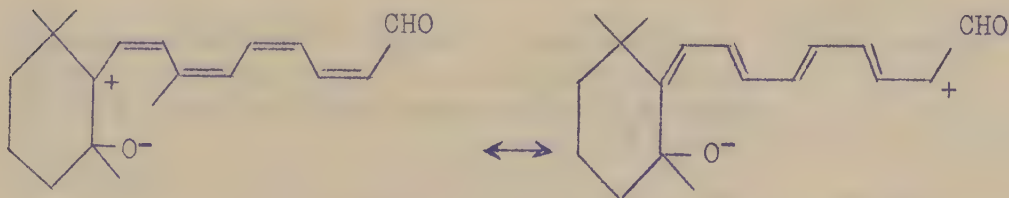
Les dosages effectués sur le corps "Y" à divers moments de sa conservation dans un dessiccateur sur P₂O₅ nous ont donné les

résultats suivants : 5 mg du produit préparé de la veille donnaient un dégagement de méthane de $0,53 \text{ cm}^3$; $0,48 \text{ cm}^3$, soit $0,47 \%$ et $0,43 \%$ d'H mobile. La théorie prévoit pour $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$ $0,62 \%$ pour 2 OH. Après un mois de conservation sur P_2O_5 , 5 mg du même échantillon fournissent un dégagement de méthane de $0,05 \text{ cm}^3$. L'H mobile est pratiquement nul.

Le dihydroxy-5-6-rétinène₁ est donc susceptible de perdre H_2O pour prendre la forme époxydique.



Il est intéressant de signaler aussi la facilité remarquable avec laquelle l'époxyde de rétinène₁ entre en état d'halochromie, ce qui serait en accord avec l'observation de Karrer sur les époxydes de caroténoïdes (24). D'après P. Meunier (34), cette ionisation implique la mésomérie suivante avec 4 doubles liaisons oscillantes, responsables de la couleur d'halochromie violacée à maximum d'absorption à $560 \text{ m}\mu$.



Le produit de la réaction au SbCl_3 , traité par l'acide chlorhydrique au tiers régénère dans le chloroforme l'époxyde inchangé à maximum $345 \text{ m}\mu$.

Enfin la réduction de l'époxyde-5-6 du rétinène₁ par l'hydrure d'aluminium et de lithium fournit un corps absorbant dans CHCl_3 à $285 \text{ m}\mu$ et dans SbCl_3 à $620 \text{ m}\mu$, que nous considérons comme le véritable époxyde de la vitamine A₁ et dont nous parlerons dans la seconde partie de ce travail.

ACTIVITE BIOLOGIQUE DE L'EPOXYDE-5-6 DU RETINENE₁
OU CORPS "Y"

Il était intéressant d'entreprendre l'étude biologique de l'époxyde de rétinène₁ dans le but de connaître son activité vitaminique A₁ et son devenir dans l'organisme du rat blanc carencé. L'étude biologique sur des rats carencés en vitamine A₁ a été entreprise par P. Meunier et R. Ferrando (35). Le produit utilisé présentait au spectrophotomètre de Beckman une bande unique à 345 mμ dans le chloroforme et 560 mμ dans SbCl₃. Le spectre de ce produit ne présentait aucune trace de rétinène₁.

Conduite de l'essai biologique :

5 groupes de rats mâles, de même origine, étaient répartis de la manière suivante :

- Groupe I : rats témoins recevant de la vitamine A₁
- Groupe II : rats recevant le corps "Y" dans l'huile
et III : d'arachide autoclavée.
- Groupe IV : rats recevant le corps "Y" à l'état de combinaison hydrazinique T : une goutte correspondant à 40 γ de corps pur pour 400 γ de réactif T.
- Groupe V : rats témoins sans vitamine A₁.

Les rats vivant dans des cages individuelles recevaient le régime suivant :

sucre	650 g
caséine lavée deux fois au CHCl ₃	150 g
levure de bière	80 g
huile d'arachide	30 g
mélange salin	40 g
papier filtre (ad libitum).	

Le mélange salin du régime comprend :

ClNa	3,46 g
SO ₄ Mg	5,32 g
PO ₄ H ₂ Na	6,94 g
PO ₄ H K ₂	19,29 g
(PO ₄ H ₂) ₂ Ca	10,80 g
lactate de chaux	2,60 g

Les rats du groupe I reçurent à partir du 26^{ème} jour 2,5 g de vitamine A₁ par jour.

A partir du 29^{ème} jour, les rats du groupe II reçurent quotidiennement 50 γ de corps "Y" en solution huileuse et ceux du groupe IV une goutte de solution aqueuse d'hydrazide T définie plus haut.

A partir du 32^{ème} jour, les rats du groupe III reçoivent 10 g par jour de corps "Y" en solution huileuse.

Résultats :

Les auteurs ont noté l'apparition des lésions de xérophtalmie et la guérison de celles-ci chez les rats recevant la vitamine A₁ ou le corps "Y".

Le numéro 4 du groupe I présentait de légers symptômes de xérophtalmie dès le 25ème jour. Ils disparaissent 7 jours après le début d'administration de vitamine A₁.

De même, le numéro 3 du groupe II présentait des accidents semblables au 28ème jour qui rétrocedent sensiblement dans le même délai avec 50 % de corps "Y" en solution huileuse par jour.

Les rats du groupe III ont tous montré des lésions oculaires après 60 jours (bien qu'ayant été atteints à des moments divers), malgré 10 γ quotidiens de corps "Y" en solution huileuse.

Les rats du groupe IV sont tous atteints de xérophtalmie après 33 jours.

Enfin 3 rats témoins sans vitamine A₁ , du groupe V, ayant survécu au 18 premiers jours de l'expérience ont montré des lésions de xérophtalmie dès le 30ème jour.

Le tableau ci-dessous indique les moyennes hebdomadaires des croissances (g) et le nombre des jours de survie (j)

		N° 1		N° 2		N° 3		N° 4		N° 5		N° 6	
		g	j	g	j	g	j	g	j	g	j	g	j
I	2,5 γ vit A ₁	9,4	92	10,4	92	7,8	92	8,9	85s	8,0	85s	8,0	92
II	50 γ corps Y	8,0	91s	6,0	91s	7,8	91s	2,2	64+	6,4	85s		
III	10 γ corps Y	3,2	58+	1,8	76+	3,0	85s	-2,0	39+	3,5	67+		
IV	40 γ corps Y	3,1	41+	2,3	39+	1,6	49+	2,8	56+	0,2	33+		
V	témoins	-0,2	10+	1,2	50+	4,4	39+	0,0	18+	3,4	32+		

(*) s = rats sacrifiés + = rats morts en cours d'expérience

Si l'on considère la cure des lésions oculaires et le nombre de jours de survie dans les groupes I et II, on constate qu'ils sont identiques, c'est-à-dire que 50% d'époxyde de rétinène₁ administrés en solution huileuse possèdent sensiblement la même activité vitaminique que 2,5% de vitamine A₁. Le corps "Y" présente donc une activité vitaminique A₁ non négligeable, mais 20 à 25 fois plus faible que celle de la vitamine A₁.

Une dose quotidienne de 10% de corps "Y" en solution huileuse est insuffisante pour prévenir la xérophtalmie et assurer une survie normale.

Quant à la combinaison hydrazinique T du corps "Y", elle est sans activité vitaminique. Ce fait ne peut provenir du réactif T qui, administré à des rats témoins, ne modifie pas leur croissance qui reste normale.

Recherche de la vitamine A dans le foie des rats d'expérience :

Au cours de cet essai, la vitamine A₁ hépatique a été recherchée chez les rats morts ou sacrifiés en fin d'expérience. La technique utilisée est la suivante : Le foie de chaque rat est broyé au mortier avec 50 g de SO₄Na₂ anhydre Merck, et agité mécaniquement avec 50 cm³ d'éther de pétrole léger (Ebull. 40-50°) pendant 1 heure. On sépare ensuite l'éther de pétrole par filtration et rince le sulfate de soude avec 2 fois 25 cm³ d'éther de pétrole. L'éther de pétrole est concentré au bain-marie tiède sous vide jusqu'au volume de 5 cm³. Ce concentré est examiné directement ou après dilution au 1/5 au spectrophotomètre de Beckman. Les courbes d'absorption des extraits hépatiques (fig. 6) montrent pour les groupes II et III la présence de vitamine A₁ dans les foies des rats ayant reçu de l'époxyde de rétinène₁. Ce corps est donc susceptible d'être stocké par le foie à l'état de vitamine A₁ au même titre que la vitamine A₁ administrée aux rats du groupe I. Des foies des rats du groupe V, ne recevant pas de vitamine A₁, ont donné une recherche négative.

Conclusions :

Les études de Glover, Goodwin et Morton (13) ont montré que chez les rats carencés en vitamine A₁ l'aldéhyde de vitamine A₁ (rétinène₁) administré par voie buccale est réduit en vitamine A₁ alcool dans la muqueuse intestinale. La réduction s'accompagne d'une estérification et c'est à l'état d'esters que, pour la plus grande partie, la vitamine A₁ est transportée vers le foie. Cet organe ne semble pas jouer de rôle dans la réduction du rétinène₁ en vitamine A₁.

L'activité vitaminique A₁ de l'époxyde de rétinène₁ sur les rats carencés est, nous l'avons vu, environ 20 à 25 fois plus faible que celle de la vitamine A₁ elle-même.

L'activité biologique du rétinène₁ et de son hydrate est

sensiblement celle de la vitamine A₁ chez le rat blanc carencé (37 et 40) donc l'oxydation diminue assez fortement l'activité biologique du rétinène₁.

Nous pensons que l'époxyde de rétinène₁ subit dans la muqueuse intestinale une réduction analogue à celle du rétinène₁. Cependant le principal intérêt de l'activité de ce corps réside dans le fait qu'il est capable de perdre son oxygène époxydique et d'être mis en réserve dans le foie à l'état de vitamine A₁.

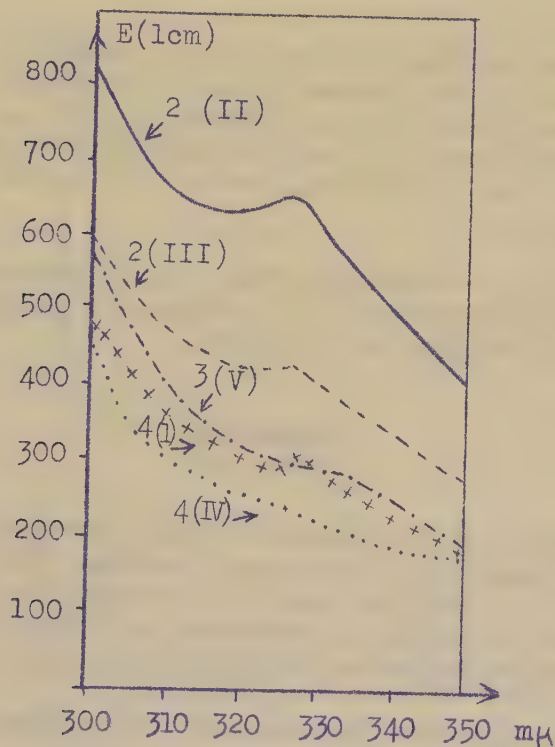


Figure 6

Courbes d'absorption des extraits hépatiques non dilués pour les groupes II, IV et V, dilués au 1/5 pour les groupes I et III.

Etant donné l'homogénéité des résultats dans chaque groupe, un seul spectre est donné par groupe, un seul spectre est donné par groupe indiqué en chiffres romains.

VITAMINES A ET VISION

Les travaux modernes sur les fonctions de photo-réception ont mis en évidence l'importance des caroténoïdes et particulièrement des vitamines A₁ et A₂. Chez les vertébrés, les pigments photosensibles sont localisés dans des cellules de la rétine, les batonnets et les cônes.

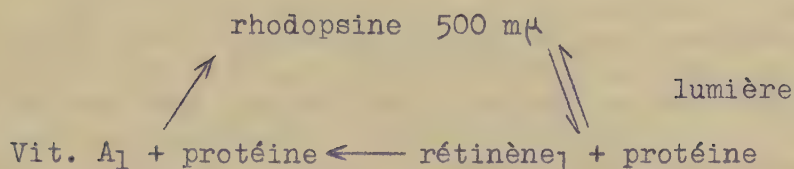
Chez des vertébrés terrestres et marins, les batonnets renferment la rhodopsine, pigment rouge en relation avec la vitamine A₁ et les cônes, l'iodopsine, pigment violet qui semble se rattacher aussi à la vitamine A₁. Chez les vertébrés d'eau douce, le pigment photosensible des batonnets, la porphyropsine, est en rapport avec la vitamine A₂.

Nous allons examiner l'état actuel des connaissances concernant ces 3 pigments rétinien : rhodopsine, porphyropsine, iodopsine et les bases biochimiques de la vision.

RHODOPSINE

Boll, en 1876, montrant la décoloration des rétines de grenouilles à la lumière et leur recoloration à l'obscurité, mettait en évidence pour la première fois l'existence d'un pigment photosensible dans la rétine. Kuhne l'extrayait en 1879 et lui donnait le nom de rhodopsine, en raison de sa coloration rouge.

Les connaissances concernant la rhodopsine se sont considérablement étendues avec les travaux de Wald démontrant l'importance de la vitamine A₁ dans la vision (47, 48, 49, 50, 51, 54) et identifiant la rhodopsine à un caroténoprotéide (48, 54). Sous l'action de la lumière, la rhodopsine se décolore et, de rétines décolorées, Wald put extraire un corps, le rétinène₁ (54). Il montra que les processus visuels constituent un cycle, car la décoloration de la rhodopsine se fait avec production de rétinène₁, puis de vitamine A₁ (48, 49, 54) et la rétine est capable de resynthétiser la rhodopsine par deux voies : lente à partir de la vitamine A₁, rapide à partir du rétinène₁. Cependant le rétinène₁, caractérisé dans les préparations par son spectre d'absorption, n'a été identifié qu'en 1944 par Morton et Goodwin (42) qui le préparèrent par oxydation permanganique de la vitamine A₁, puis par Ball, Goodwin et Morton (1a,b) qui l'obtinrent par action du bioxyde de manganèse sur l'axérophtol. Ces auteurs montrèrent que le corps synthétique dont le spectre d'absorption dans l'U.V. et la réaction au SbCl₃ sont identiques à ceux du rétinène₁, extrait par Wald, n'est autre que l'aldéhyde de la vitamine A₁ ou axérophtal. A la lumière des connaissances nouvelles, le cycle proposé par Wald en 1935 :



selon lequel la rhodopsine décomposée à la lumière est resynthétisée à l'obscurité, pouvait être étudié plus étroitement dans ses étapes intermédiaires.

La rhodopsine est un caroténoprotéide dans lequel la protéine ou opsine (Wald, 62) est liée à un groupement prosthétique caroténoïdique qui donne à la molécule sa coloration et sa sensibilité à la lumière. Le spectre d'absorption de la rhodopsine présente 3 bandes (Wald, 62) (fig. 7) : α vers 500 m μ , β vers 350 m μ , γ vers 278 m μ

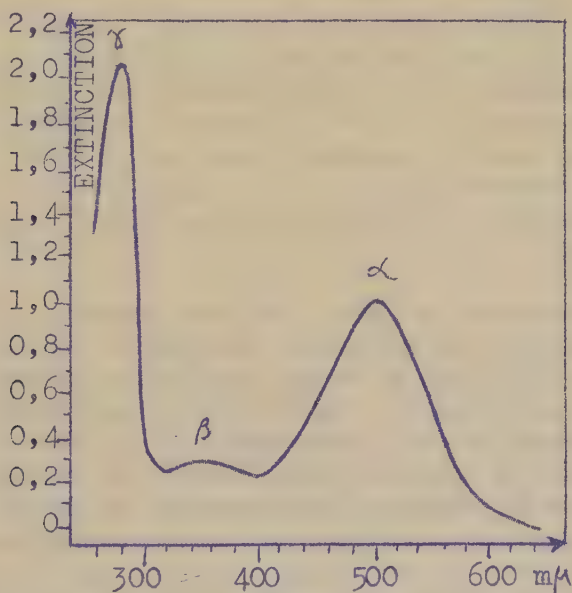


Figure 7

Spectre de la rhodopsine, d'après G. WALD.

Selon Wald, l'union de 2 molécules de vitamine A₁ ou de rétinène₁ formant un système à doubles liaisons conjuguées déterminerait la position de la bande α , tandis que la bande β serait un cispéak, comparable à ceux que l'on observe dans les spectres d'absorption de nombreux caroténoïdes. Les bandes α et β impliqueraient ainsi la nature caroténoïdique du groupement prosthétique de la rhodopsine. Quant à la bande γ , elle est due à l'opsine. Dans l'action de la lumière sur la rhodopsine, seul le groupement prosthétique intervient. Wald (62) a montré en effet que, dans le blanchiment de la rhodopsine en solution, les bandes α et β sont remplacées par le spectre du rétinène₁, tandis que la bande γ demeure inchangée.

Sous l'action de la lumière, la rhodopsine fournit un pigment orangé présentant un spectre d'absorption à 480 m μ . Ce corps, appelé "transient orange" par Lythgoe (29), très instable est produit par une réaction photochimique. Tous les autres intermédiaires du blanchiment de la rhodopsine sont fournis par des réactions chimiques pures - ou "d'obscurité" (Wald) - indépendantes des conditions d'éclairement. Ces réactions aboutissent à un produit jaune assez stable appelé par Lythgoe "indicator yellow" (54, 29, 52, 30). Ce corps, très sensible aux variations de pH, présente une coloration jaune orangée en milieu acide, λ maximum à 440 m μ , tandis qu'il est pratiquement incolore en milieu alcalin, λ maximum à 365 m μ . Selon Wald (62), il serait un mélange de rétinène₁ et d'opsine en partie lâchement liés l'un à l'autre.

Le processus photo-chimique du blanchiment de la rhodopsine a été étudié plus profondément à -78° par Broda et Goodeve (6). A cette température, les processus "d'obscurité" sont pratiquement éliminés. Wald (62) a observé qu'aux températures comprises entre -40 et -100°C la rhodopsine, irradiée totalement avec une lumière blanche, montre un déplacement spectral de 5 m μ environ vers les petites longueurs d'ondes. Il y a production de lumirhodopsine et ce serait la seule étape photochimique du blanchiment. En effet, la lumirhodopsine, portée à l'obscurité à -20°, produit la métarhodopsine (transient orange ?) avec un déplacement spectral du côté des courtes longueurs d'ondes. La métarhodopsine, à la température du laboratoire, (+20°), fournit ensuite un mélange de rhodopsine régénérée et d'indicator yellow (60 8).

D'autres études de Wald (60) concernant la rhodopsine préparée sur des films de gélatine secs ont établi qu'elle présente un spectre analogue à celui de la rhodopsine en solution. Par exposition à la lumière, il y a de même production de lumirhodopsine qui se transforme en métarhodopsine à l'obscurité. Celle-ci est stable aussi longtemps qu'elle est conservée sèche mais, en l'humidifiant à l'obscurité, elle produit un mélange d'indicator Yellow et de rhodopsine en quantités approximativement égales. Cette rhodopsine régénérée, de même que celle régénérée en solution à partir de la métarhodopsine, possède un spectre situé à des longueurs d'ondes légèrement plus basses que la rhodopsine extraite de la rétine. Collins et Morton (8) l'ont appelée isorhodopsine. Wald (62) la considère comme un mélange de rhodopsine pure et de rhodopsine altérée.

Ces observations conduisent Wald (62) à rapprocher le blanchiment de la rhodopsine du processus photographique. L'action de la lumière sur les films de gélatine supportant la rhodopsine produit en effet, comme en photographie, un changement visible très minime. Les grandes variations résultent, dans l'un et l'autre cas, des réactions ultérieures d'"obscurité", c'est-à-dire "de développement". La métarhodopsine, formée dans des films de gélatine, peut être conservée et développée à n'importe quel moment par mouillage à l'obscurité (62). Wald (62) considère que la rapidité des réponses du nerf optique, lorsque la rétine est exposée à la lumière, dépend essentiellement de la réaction photochimique, c'est-à-dire de la production de métarhodopsine, les réactions ultérieures d'ordre purement chimique concer-

nant le blanchiment en rétinène₁ étant relativement plus lente.

Si l'on considère donc le blanchiment de la rhodopsine en solution, le terme final est la production de rétinène₁ et, la réaction étant réversible, à l'obscurité la rhodopsine est régénérée.

Dans la rétine, le rétinène₁ formé est réduit par un système enzymatique en vitamine A₁ (58). Dans ce système interviennent: un apoenzyme, la rétinène-réductase, un coenzyme, la cozymase (DPN). Wald en assemblant le système suivant a pu obtenir la réduction du rétinène₁ en vitamine A₁ :

- coenzyme réduit DPN - H₂
- substrat : rétinène₁ obtenu par action de MnO₂ sur la vit. A₁
- apoenzyme : extrait aqueux de rétines homogénéisées ou de batonnets.

Selon Wald, l'apoenzyme des rétines de poissons d'eau douce réduit aussi bien le rétinène₁ que le rétinène₂ en vitamine A correspondante. Cette rétinène-réductase serait peut-être identique à l'alcool déshydrogénase (62,5). Quant au coenzyme, il fait intervenir comme substance clé le nicotamide.

La synthèse de la rhodopsine avait déjà été envisagée par Kuhne selon un mode rapide (anagénèse) à partir des produits jaunes ou orangés du blanchiment pouvant se produire en solution, et un mode lent (néogénèse) à partir des précurseurs incolores que l'on sait maintenant être le rétinène₁ et la vitamine A₁. Selon Hecht (16), la régénération de la rhodopsine en solution n'excède pas 15 %. Cependant, si du rétinène₁ synthétique est ajouté, on peut avoir un rendement de 85 % (61). D'ailleurs Wald et Brown (61) ont obtenu une synthèse rapide de la rhodopsine à partir de rétinène₁ synthétique et d'opsine extraite des batonnets de grenouilles, cette opsine réagissant également bien avec le rétinène₂.

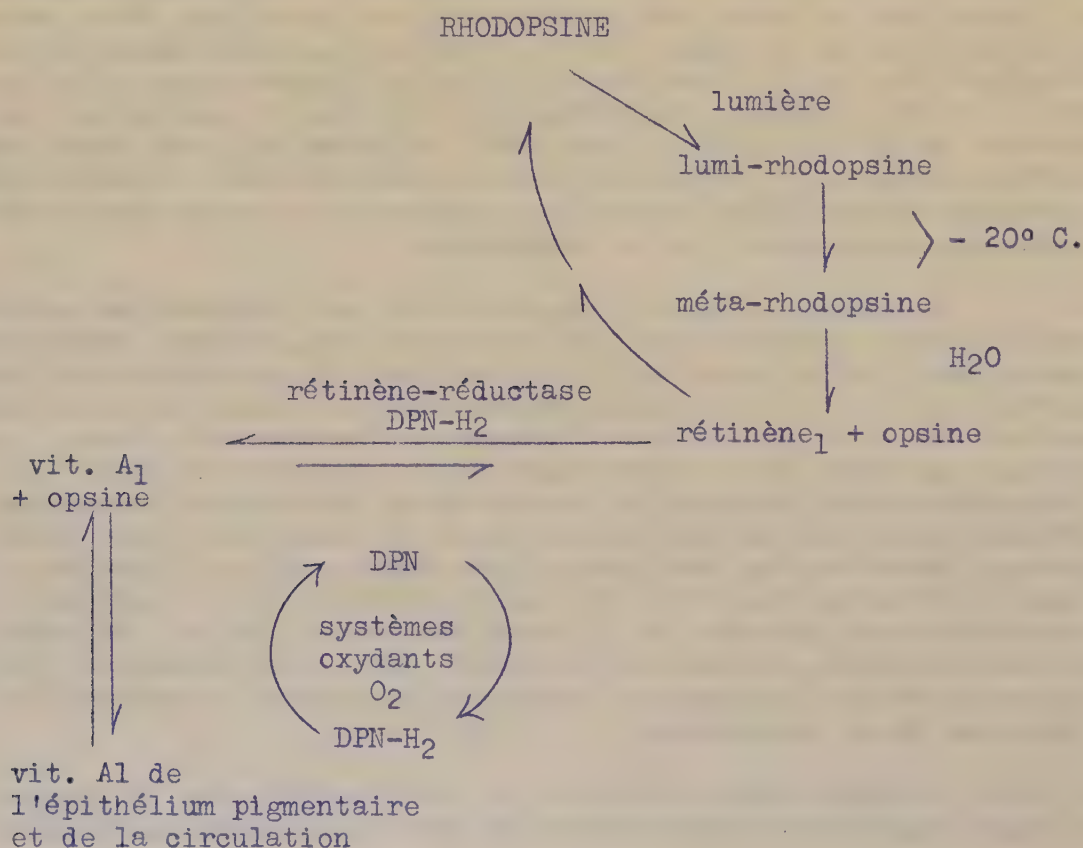
Le rôle du rétinène₁ en excès dans ces préparations serait, selon Wald (62), d'éviter une perte d'opsine qui s'altère rapidement en solution. D'autre part, lors du blanchiment de la rhodopsine, le rétinène₁ quitte ses positions d'attachement à l'opsine pour se coupler avec d'autres groupes sur l'opsine et d'autres molécules. Le rétinène₁ en excès aurait alors pour rôle de saturer ces positions et de rendre ainsi une quantité de rétinène₁ directement disponible, suffisante pour une synthèse rapide de la rhodopsine. Dans cette synthèse, interviennent des groupements -NH₂ et -SH de l'opsine. Ainsi que l'ont montré Wald (62) et Wald et Brown (61), la synthèse de la rhodopsine est bloquée par l'hydroxylamine qui lie le rétinène₁ sous forme d'oxime, le formol qui réagit avec les groupements -NH₂ et surtout -SH de l'opsine, qui semblent jouer un rôle essentiel dans la synthèse de la rhodopsine.

Cependant dans la rétine, le système rétinène réductase peut aussi diriger la réaction dans le sens de l'oxydation. Wald (18),

utilisant NH_2OH comme accepteur de rétinène₁, a pu obtenir à partir d'homogénéisats de rétines une oxydation de la vitamine A₁ en rétinène₁ avec un rendement de 50 % environ. Selon Wald (62), l'opsine jouerait dans la rétine le rôle d'accepteur de rétinène₁, l'énergie requise pour oxyder la vitamine A₁ serait fournie par la condensation de l'opsine et du rétinène₁. Il y aurait ainsi une oxydation continue de vitamine A₁ en rétinène₁, celui-ci étant éliminé dès sa formation pour resynthétiser la rhodopsine.

Wald a d'autre part éclairci le rôle de la vitamine A₁ dans la synthèse de la rhodopsine. Les rétines intactes ou homogénéisées, complètement blanchies par irradiation régénèrent à l'obscurité la rhodopsine en très petite quantité. Cependant le rendement est accru par addition de cozymase et d'homogénéisat de couches pigmentaires. Les couches pigmentaires apporteraient donc un facteur inconnu que Wald identifie à la vitamine A₁, car l'addition de cozymase, d'homogénéisat de couches pigmentaires et de vitamine A₁ provoque une régénération de 60 % environ (18,19). Un système comprenant vitamine A₁, cozymase, opsine et déshydrogénase purifiée de Bonnichsen produit la rhodopsine à l'obscurité. Selon Wald (62), ce qui a été interprété comme une synthèse de la rhodopsine à partir de la vitamine A₁ ne consisterait donc qu'en une oxydation de la vitamine A₁ en rétinène₁ par le système de la rétinène-réductase, couplée avec la condensation du rétinène₁ avec l'opsine, pour former la rhodopsine.

Wald (62) résume dans le diagramme suivant les étapes connues du cycle de la rhodopsine :



PORPHYROPSINE

Dans les batonnets des vertébrés d'eau douce se trouve un pigment pourpre auquel Wald a donné le nom de porphyropsine (55). La porphyropsine dans les processus visuels joue un rôle identique à celui de la rhodopsine et forme un cycle où interviennent la vitamine A₂ et le rétinène₂ (Wald). La vitamine A₂ présente un maximum d'absorption à 355 mμ dans CHCl₃ et 696 mμ dans SbCl₃, le rétinène₂ à 405 mμ dans CHCl₃ et 705 mμ dans SbCl₃. Le spectre de la porphyropsine en solution comme celui de la rhodopsine est à trois bandes, les bandes α et β étant très déplacées vers le rouge respectivement à 522 et 370 mμ.

La structure de la vitamine A₂ vient d'être élucidée (10) mais Morton avait déjà obtenu, par action de MnO₂, l'aldéhyde correspondant ou rétinène₂ (43). Selon Wald (62), les expériences de combinaison de l'opsine avec le rétinène₂ et de réduction in vitro du rétinène₂ en vitamine A₂ permettent de penser que la porphyropsine possède un cycle tout à fait identique à celui de la rhodopsine, la resynthèse du pigment s'effectuant aussi à partir du rétinène₂ et de la vitamine A₂.

IODOPSINE

Les connaissances concernant l'iodopsine, pigment violet photosensible des cônes, sont beaucoup moins étendues. Dans une région de la rétine, la fovéa, il n'y a que des cônes et Wald (56) a montré que le maximum de sensibilité de la fovéa est à environ 562 mμ.

Wald expérimentant sur des rétines de poulets (53) adaptés à l'obscurité a pu mettre en évidence le spectre d'absorption de l'iodopsine. Par irradiation par une lumière rouge foncé ($\lambda = 650$ mμ environ), Wald obtint un maximum d'absorption à 565-575 mμ environ qu'il considère comme représentant le pigment photolabile des cônes. Si l'on soumet ensuite le même extrait de rétines à une lumière blanche, le spectre obtenu est caractéristique de la rhodopsine. Les résultats de Wald ont été confirmés par Bliss (4) qui, à partir d'une préparation d'iodopsine, a montré la production de rétinène₁ par action de la lumière. La chimie de l'iodopsine est encore mal connue. Cependant il semble probable qu'elle soit aussi un caroténoprotéide (Wald 59) dont le groupement prosthétique serait la vitamine A₁, le rétinène₁ ou un de leurs dérivés. Cette hypothèse est confirmée expérimentalement par le fait que la carence en vitamine A₁ touche à la fois les batonnets et les cônes, leurs fonctions étant régénérées par administration de vitamine A₁.

BIOCHIMIE DE LA VISION

On a admis depuis Schultze la théorie impliquant aux batonnets un rôle exclusivement dans la vision crépusculaire ou scotopique, tandis que les cônes fonctionneraient dans la vision diurne ou photopique. L'effet conjugué de la carence en vitamine A₁ sur les batonnets et les cônes réfute déjà cette théorie. On sait cependant que la vision scotopique n'est pas accompagnée de sensations colorées tandis que la vision photopique implique la discrimination des couleurs.

Les recherches effectuées en vue d'apporter une base biochimique à la théorie trichromatique de Young-Helmoltz de la vision des couleurs ont toutes plus ou moins échouées. Les procédés utilisant en particulier des lumières monochromatiques dans l'espoir de mettre en évidence des récepteurs rétiniens fonctionnant à l'intérieur de limites spectrales déterminées n'ont pas apporté de résultats précis.

Selon Wald (53,59), chez les poulets et de même chez de nombreux oiseaux et reptiles, on trouve dans la partie externe des cônes des globules huileux très colorés comprenant 3 pigments : un pigment jaune qui serait un caroténoïde, un pigment rouge, l'astaxanthine, un pigment doré, la lutéine. Ces 3 pigments intervenant comme filtres joueraient un rôle dans la vision des couleurs.

Ce sont surtout les travaux de Granit (15) qui ont apporté des résultats d'un intérêt considérable dans la connaissance des phénomènes de la vision. Granit opérant à l'aide de microélectrodes put obtenir des réponses à l'excitation lumineuse à partir de régions extrêmement limitées de la rétine (batonnets, cônes et même d'une seule cellule). En utilisant des lumières monochromatiques et en déterminant les intensités minima nécessaires pour obtenir une réponse il réussit à tracer les courbes de sensibilité des batonnets et des cônes. Ces courbes lui ont permis de diviser les substances photosensibles de la rétine en 2 groupes : les dominateurs et les modulateurs.

Selon Granit, les dominateurs sont des mécanismes sensoriels fonctionnant en lumière scotopique ou photopique dont les courbes de sensibilité assez larges rendent propres à la vision des longueurs d'ondes situées dans des limites spectrales assez étendues. De ce fait, les dominateurs interviendraient seulement dans la sensation de brillance et seraient impropres à la discrimination des couleurs. Les spectres d'action des dominateurs de Granit à λ maxima à 500 et 560 m μ les identifient à la rhodopsine et l'iodopsine.

Les modulateurs au contraire sont des mécanismes sensoriels qui, en lumière photopique, montrent des spectres d'action situés dans 3 régions spectrales : 440-470 m μ , 520-540 m μ , 580-600 m μ . De plus, un modulateur photosensible apparaît à 500 m μ environ. Les courbes de sensibilité des modulateurs présentant des sommets aigus les rendraient particulièrement propres à la différenciation des couleurs.

Cependant la nature chimique de ces récepteurs est encore inconnue. Du fait que l'iodopsine produit aussi du rétinène₁, Morton (44) pense qu'aucune "substance-clé" autre que la vitamine A₁ puisse être invoquée. Dès 1942, Meunier (31,33) avait montré que la coloration bleue obtenue lorsque la vitamine A₁ est mise en présence de SbCl₃ ou de terres acides, correspond à une "ionisation" ou "halochromie" de la molécule. Ball et Morton (2) étudièrent alors les spectres d'halochromie donnés par la vitamine A₁ et le rétinène₁ sous l'action de SO₄H₂ concentré et de PO₄H₃ concentré, à la température de 0°C. Ils constatèrent que les bandes obtenues ne correspondent pas à un corps possédant plusieurs maxima d'absorption mais à plusieurs substances possédant chacune un maximum d'absorption. Les résultats obtenus dans le tableau suivant montrent bien que les spectres d'halochromie de la vitamine A₁ et du rétinène₁ concordent avec les spectres modulateurs de Granit.

Comparaison des spectres d'action des modulateurs de Granit et des spectres d'absorption de la vitamine A₁ et du rétinène₁ dissous dans les acides forts :

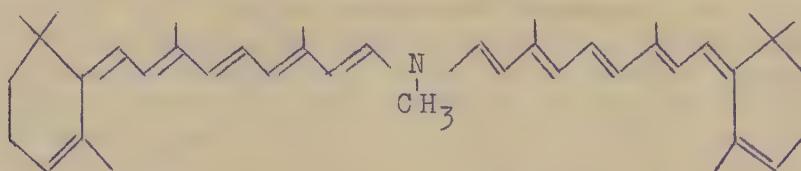
Maxima d'absorption en mμ						
rhodopsine		500				
iodopsine				560		
dominateurs		500		560		
modulateurs	450-465	500	520-530	-	580-610	-
vit. A ₁ dans SO ₄ H ₂	465	-	520-530	-	590	620
vit. A ₁ dans PO ₄ H ₃	440-480	-	520	-	-	620
rétin. ₁ dans SO ₄ H ₂	440-460	-	520	560	-	664
rétin. ₁ dans PO ₄ H ₃	470	500	-	550	590	664

Bien que les auteurs insistent sur les conditions non physiologiques de la production de ces molécules ionisées, l'analogie avec les modulateurs de Granit s'accroît du fait que ces analogues-modulateurs obtenus sont sensibles à l'action de la chaleur et de la lumière.

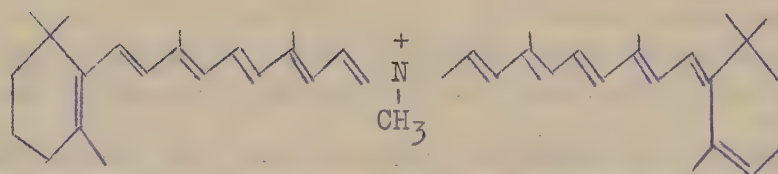
Selon Morton (2), les récepteurs photopiques seraient des protéines conjuguées présentes à la surface des cônes, dont le groupement prosthétique, dérivé de la vitamine A₁ ou du rétinène₁, se détacherait de la protéine au moment de la perception lumineuse et se trouverait alors en état d'halochromie. La rétine réaliserait les conditions nécessaires à la formation des modulateurs, molécules ionisées instables. Pour Wald (57), les produits de l'action de SbCl₃ sur la vitamine A₁ et le rétinène₁ approcheraient étroitement les structures fondamentales des photopigments visuels. Le groupement chromophore de la rhodopsine formerait un système conjugué comportant un nombre de doubles liaisons conjuguées double de celui de la

vitamine A₁ ou du rétinène₁. Il y aurait formation de molécules semblables à la di-vitamine A éther obtenue par Meunier et A. Vinet (32) par chromatographie de la vitamine A₁ sur hydroxyde de calcium ou terres acides ou par traitement avec SbCl₃, ce corps provenant de la condensation de 2 molécules de vitamine A₁ avec élimination d'une molécule d'eau. Wald pense que l'union de 2 molécules de vitamine A₁ ou de rétinène₁ formant un système entièrement conjugué expliquerait le décalage entre le spectre de la vitamine A₁ à 328 mμ ou du rétinène₁ à 370-390 mμ et celui de la rhodopsine à 500 mμ.

Ball, Collins, Dalvi et Morton (3) ont obtenu synthétiquement des corps rappelant par leur comportement spectral la rodopsine et l'indicator yellow de Lythgoe. Par action de l'aniline en milieu acide sur le rétinène₁, ils ont produit un chromophore analogue à la rhodopsine, absorbant à 500 mμ. D'autre part, en faisant réagir sur le rétinène₁ des composés aminés tels que la monométhylamine et la β-alanine, ils ont pu reproduire les spectres de l'indicator Yellow en milieu alcalin à 365 mμ et en milieu acide à 440 mμ. Dans ces analogues d'indicator Yellow, 2 molécules de rétinène₁ seraient unies à une molécule de composé aminé de la manière suivante :



365 mμ en milieu alcalin



440 mμ en milieu acide

Bien que ces hypothèses concernant la biochimie de la vision ne soient souvent, de l'avis des auteurs, que des hypothèses de travail, il est permis de penser qu'elles simulent assez singulièrement la constitution des photopigments de la rétine. Cependant, il est possible que d'autres pigments interviennent dans le processus visuel. L'astaxanthine signalée à la surface des cônes de poulets par Wald (53) et étudiée par Grangaud (14), possédant une action spécifiquement antixérophtalmique sans reprise de poids chez le rat blanc carencé en vitamine A₁ et se localisant dans la rétine après administration chez le rat carencé en vitamine A₁, pourrait aussi intervenir dans la formation des pigments rétinien.

ROLE POSSIBLE DE L'EPOXYDE-5-6 DU RETINENE₁ OU CORPS "Y"

DANS LA BIOCHIMIE DE LA VISION

Le maximum de sensibilité des cônes de la fovéa à 562 mμ (Wald, 56) et la facilité remarquable avec laquelle l'époxyde de rétinène₁ entre en état d'halochromie avec λ maximum à 560 mμ, avaient conduit P. Meunier (35) à penser que le corps "Y" se présenterait comme le récepteur des cônes et qu'il pourrait former in vivo un cycle où il prendrait la place du rétinène₁ dans la molécule d'iodopsine.

Nous avons vu que selon la conception de Morton (2) la vitamine A₁ et le rétinène₁ sont à l'état de molécules ionisées ou halochromiques au moment de la perception lumineuse. D'autre part, les spectres des dominateurs de Granit comportent un maximum à 560 mμ. L'époxyde de rétinène₁ en halochromie, par sa bande unique à 560 mμ, serait donc typiquement un DOMINATEUR.

Nous avons étudié le comportement du corps "Y" en présence de SO₄H₂ concentré et de composés aminés selon les techniques de Ball et Morton (2) et de Ball, Collins, Dalvi et Morton (3).

L'époxyde-5-6 du rétinène₁ en solution chloroformique, agité avec SO₄H₂, concentré à la température de 0° C environ, donne naissance à une coloration violette fugace dans la couche chloroformique à λ maximum 560 mμ.

En solution alcoolique, en présence d'acide chlorhydrique et d'un excès d'aniline, l'époxyde de rétinène₁ fournit un chromophore jaune orangé absorbant à 475 mμ environ.

En solution alcoolique alcalinisée par la soude et en présence de monométhylamine en grand excès, après une heure à l'obscurité, l'époxyde de rétinène₁ montre un déplacement spectral de 342 mμ à 320 mμ environ. Le mélange est alors pratiquement incolore mais l'acidification par HCl concentré fait virer la coloration au jaune d'or avec λ maximum à 380 mμ environ.

Rappelons que, avec SO₄H₂ concentré, la vitamine A₁ et le rétinène₁ donnent les spectres modulateurs de Granit. Le rétinène₁ d'autre part fournit avec l'aniline en milieu acide un chromophore analogue à la rhodopsine absorbant à 500 mμ ; avec la monométhylamine et la β-alanine, il donne des analogues de l'indicator Yellow en milieu alcalin (365 mμ) et en milieu acide (440 mμ).

L'époxyde de rétinène₁ présente donc deux groupes de réactions importantes :

1°- avec SO₄H₂ concentré, vers 0°C., il donne une seule bande

fugace à 560 m μ et diffère en cela du rétinène₁. Cependant il est intéressant de noter un maximum d'absorption à 560 m μ obtenu par Morton (2) dans les analogues modulateurs provenant de l'action de SO₄H₂ concentré sur le rétinène₁.

2°- d'autre part l'époxyde de rétinène₁ se combine facilement avec l'aniline en milieu acide pour donner un chromophore à 475 m μ environ, avec la monométhylamine en milieu alcalin avec λ maximum à 320 m μ environ et en milieu acide à 380 m μ environ. Ces spectres d'absorption sont nettement différents de ceux obtenus avec le rétinène₁ dans les mêmes conditions.

Ces réactions associées à l'action vitaminique A₁ non négligeable de l'époxyde de rétinène₁ avec guérison des lésions de xérophtalmie chez le rat blanc carencé, nous permettent l'hypothèse suivante :

L'époxyde-5-6 du rétinène₁ pourrait intervenir comme dominateur dans les processus visuels mais nous ne pensons pas qu'il entre comme groupement prosthétique dans la molécule d'iodopsine puisque le chromophore obtenu avec l'aniline en milieu acide se situe à 475 m μ environ.

Cependant dans des conditions réalisées dans la rétine, il pourrait se présenter comme produit d'oxydation de la vitamine A₁ ou du rétinène₁ et former un cycle semblable à celui de la rhodopsine, cycle rendu possible par sa facilité de combinaison avec les composés aminés.

DEUXIEME PARTIE

EPOXYDE DE VITAMINE A₁

C'est grâce aux travaux fondamentaux de Karrer que l'on connaît la préparation et les propriétés des époxydes des caroténoïdes. Bien que l'époxyde de vitamine A₁ ait été préparé dès 1945 par Karrer et Jucker, on est mal renseigné sur sa constitution chimique.

A partir de l'époxyde-5-6 du rétinène₁, il nous a été facile de préparer par réduction l'époxyde de vitamine A₁ et d'étudier ses propriétés et en particulier son comportement sous l'action de l'acide chlorhydrique.

Préparation :

200 mg d'époxyde de rétinène₁ pur, dissous dans 20 cm³ d'éther sulfurique anhydre sans peroxydes, sont traités par 400 mg d'hydrure d'aluminium et de lithium en solution dans l'éther sulfurique. Après 15 minutes, l'excès d'hydrure est détruit par l'eau dans un bain de glace. On ajoute ensuite un léger excès de potasse aqueuse à 10 % et la solution étherée est décantée, lavée à l'eau distillée jusqu'à neutralité au papier de tournesol. L'éther séché sur SO₄Na₂ anhydre est distillé sous vide.

Propriétés :

On obtient ainsi un produit huileux jaune clair présentant un spectre d'absorption à 285 mμ dans le chloroforme et 282 mμ dans l'alcool (fig.8). Par action de SbCl₃ en solution chloroformique, il fournit une coloration violacée faisant place instantanément à une coloration bleue présentant une bande unique à 620 mμ. L'intensité d'absorption à 620 mμ décroît assez rapidement et en quelques minutes la décoloration est totale.

NOUS CONSIDERONS CE CORPS COMME LE VERITABLE EPOXYDE DE LA VITAMINE A₁ .

En effet, par action de l'acide perphthalique sur l'axéroph tol, Karrer et Jucker (22, 25) avaient obtenu un époxyde qu'ils considéraient comme identique à un caroténoïde, l'Hépaxanthine, extrait d'huile de foies de poissons. Ce corps présentait dans l'U.V. un maximum à 275 mμ. Avec une solution chloroformique de SbCl₃, il produisait une coloration violette à λ maximum 575-580 mμ qui, après une minute environ, donnait une coloration bleue à λ maximum 620 mμ environ. Selon Karrer (23), sous l'action de SbCl₃, ce corps perdrait

son oxygène et se conduirait alors comme la vitamine A₁ elle-même.

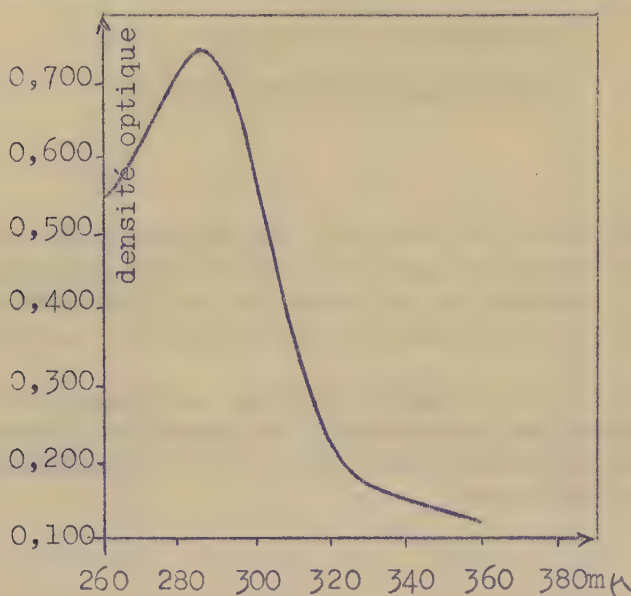
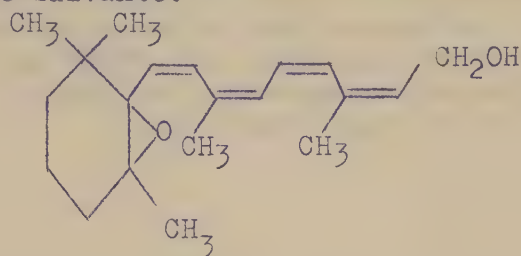


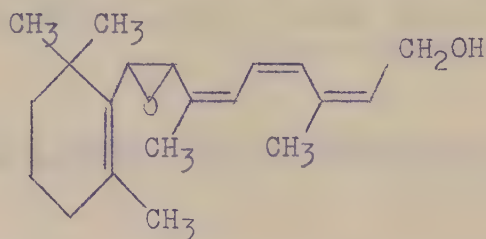
FIGURE 8

Spectre dans le chloroforme de l'époxyde de vitamine A₁

Les caractères spectraux de ce corps avaient conduit Karrer à admettre la formule suivante.



Cependant devant la grande différence (50 mμ environ) entre le maximum d'absorption de la vitamine A₁ dans l'U.V. (328 mμ) et celui de cet époxyde (275 mμ), Karrer admettait comme possible cette autre formule :

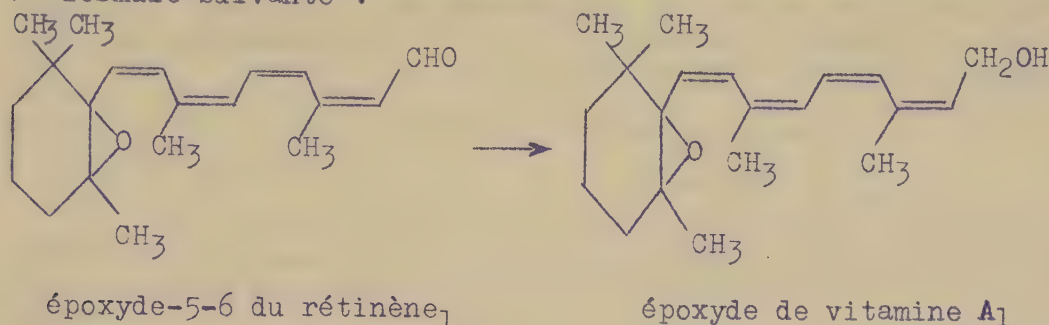


où l'oxygène s'est fixé sur la double liaison éthylinique voisine du noyau β-ionone.

La constitution de l'époxyde de vitamine A₁ était par conséquent incertaine. Swern en 1947 (46) montrait que l'acide perchlorique attaque une double liaison bitertiaire à une plus grande vitesse qu'un autre type de double liaison, ce qui est en accord avec la

formation préférentielle des époxydes au noyau de la β -ionone quand les caroténoïdes sont traités par les peracides. De ce fait, selon Milas (41), le maximum d'absorption à $275 \text{ m}\mu$ donné par les préparations d'époxydes de Karrer serait un peu bas pour 4 doubles liaisons conjuguées dans la molécule, il devrait se situer à $285\text{-}290 \text{ m}\mu$. Ce maximum serait en plein accord avec celui observé pour un échantillon de vitamine A_1 auto-oxydée et pour l'époxyde de l'éther méthylique synthétique de l'axérophtol (Milas et Coll. 41).

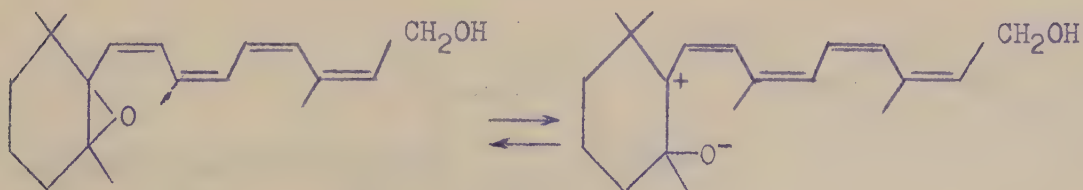
L'époxyde-5-6 du rétinène₁ nous permettait de passer facilement à l'époxyde de vitamine A_1 auquel nous assignons par conséquent la formule suivante :



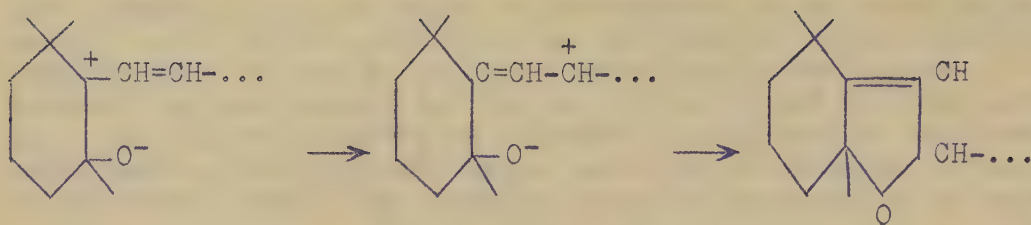
Le maximum d'absorption de ce corps à $285 \text{ m}\mu$ dans le chloroforme et $620 \text{ m}\mu$ dans SbCl_3 le différencie nettement de l'époxyde de Karrer absorbant à $275 \text{ m}\mu$ dans CHCl_3 et $580 \text{ m}\mu$ puis $620 \text{ m}\mu$ dans SbCl_3 .

Cependant Karrer (23) avait montré l'intérêt considérable qui s'attache à l'action de l'acide chlorhydrique sur les époxydes de caroténoïdes. Ceux-ci traités en solution chloroformique par HCl donnent naissance à des corps dont le maximum d'absorption dans l'U. V. est déplacé du côté des longueurs d'ondes plus courtes. Ces corps dans lesquels le cycle renfermant l'oxygène est beaucoup plus stable que celui de l'époxyde sont les isomères furanniques des époxydes des caroténoïdes.

En effet, les époxy-caroténoïdes perdent facilement une partie de leur oxygène et l'époxyde de vitamine A_1 pourrait exister sous les formes électromères suivantes :



L'atome de carbone positif attire une paire d'électrons de la double liaison voisine, le second carbone de la chaîne aliphatique devient plus positif et se lie à l'atome d'oxygène négatif avec formation d'un cycle furannique :



Nous avons pu réaliser le passage de l'époxyde de vitamine A₁ en son isomère furannique de la manière suivante : l'époxyde de vitamine A₁ dissous dans le chloroforme est traité par HCl concentré. Après 3 minutes environ, on observe un déplacement de la bande initiale de 285 à 275 mμ (fig. 9).

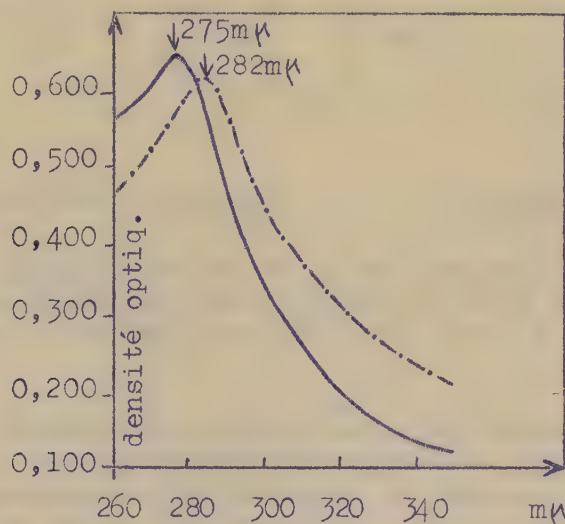
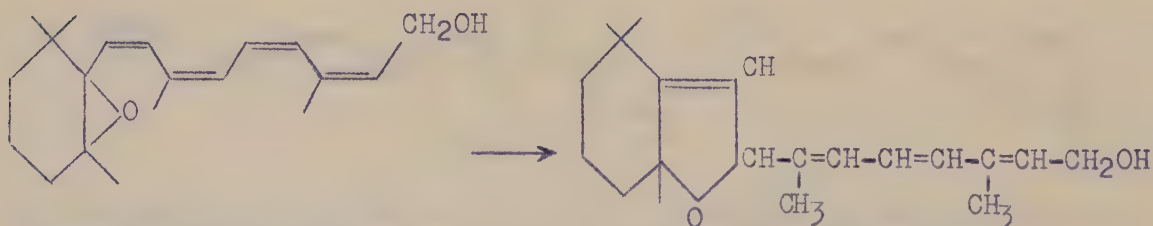


FIGURE 9

Spectres d'absorption de l'époxyde de vitamine A₁ (282mμ) et de son isomère furannique (275 mμ) dans l'alcool.

Par addition d'une solution chloroformique de SbCl₃, on obtient une coloration violette stable présentant un maximum à 575mμ. Il s'est donc opéré selon le mécanisme précédent la transposition suivante :



285 mμ dans CHCl₃
282 mμ dans Alcool
620 mμ dans SbCl₃

275 mμ dans CHCl₃
575 mμ dans SbCl₃

Ce corps huileux jaune clair, différent de $10\text{ m}\mu$, par sa bande dans l'U.V., de l'époxyde de vitamine A_1 , s'en différencie encore par la coloration violette stable donnée par la réaction de Carr-Price à bande unique à $575\text{ m}\mu$. Cette solution traitée par HCl au 1/3 laisse dans le chloroforme, le produit initial absorbant à $275\text{ m}\mu$.

EN CONCLUSION, l'époxyde-5-6 du rétinène₁ ou corps "Y" conduit, par réduction, à l'époxyde de vitamine A_1 véritable, absorbant à $285\text{ m}\mu$ dans CHCl_3 et $620\text{ m}\mu$ dans SbCl_3 . Ce corps fournit par action de l'acide chlorhydrique son isomère furannique absorbant à $275\text{ m}\mu$ dans CHCl_3 et $575\text{ m}\mu$ dans SbCl_3 . Les bandes d'absorption de l'isomère furannique concordent avec celles trouvées par Karrer pour ses préparations d'époxyde de vitamine A_1 ou hépaxanthine, et nous assignons à l'époxyde de Karrer la formule de l'isomère furannique de l'époxyde de vitamine A_1 .

Le fait que cet auteur ait trouvé dans le trichlorure d'antimoine un maximum éphémère à $575\text{ m}\mu$ donnant une bande à $620\text{ m}\mu$ semble montrer que les 2 produits étaient présents dans les préparations.

ACTIVITE BIOLOGIQUE DE L'EPOXYDE DE VITAMINE A₁

L'activité biologique de l'époxyde de vitamine A₁ a été déterminée dans les mêmes conditions que celle du corps "Y" sur des rats blancs carencés en vitamine A₁.

L'époxyde était administré aux rats, en solution dans l'huile de germe de maïs, le produit ne montrant au spectrophotomètre de Beckman, aucune trace de corps étrangers (Cf. fig. 8).

Conduite de l'essai biologique :

4 groupes de rats de même origine étaient répartis de la manière suivante :

groupe I - 3 rats témoins ne recevant pas de vitamine A₁ mais une goutte d'huile de germe de maïs ayant servi à solubiliser le produit à essayer et la vitamine A₁ du groupe II.

groupe II - 4 rats recevant quotidiennement 1,5 % de vitamine A₁ en solution dans l'huile de germe de maïs (une goutte de solution = 1,5 %).

groupe III - 4 rats recevant par jour 10 % d'époxyde de vitamine A₁ en solution dans l'huile de germe de maïs (1 goutte de solution = 10 %).

groupe IV - 5 rats recevant par jour 20 % d'époxyde de vitamine A₁ en solution dans l'huile de germe de maïs (1 goutte de solution = 20 %).

Les rats, vivant dans des cages individuelles, étaient nourris avec le même régime que celui utilisé dans l'essai de l'époxyde -5-6 du rétinène₁; à raison de 8 g par jour jusqu'au 20^{ème} jour et 12 g à partir du 20^{ème} jour.

Les rats étaient suivis par une pesée quotidienne et les produits étaient administrés au moment où les animaux commençaient à perdre du poids, de la manière suivante :

groupe I - 1 goutte d'huile de germe de maïs à partir du 16^{ème} jour.

groupe II - 1,5 % de vitamine A₁ en solution dans l'huile de germe de maïs à partir du 16^{ème} jour.

groupe III - 10 % d'époxyde de vitamine A₁ en solution dans l'huile de germe de maïs à partir du 18^{ème} jour.

groupe IV - 20 % d'époxyde de vitamine A₁ en solution dans l'huile de germe de maïs à partir du 18ème jour.

Résultats :

Il est intéressant de noter l'apparition de lésions de xérophtalmie chez les rats des divers groupes.

Dans le groupe I, les rats, ne recevant pas de vitamine A₁, présentent tous de légers symptômes de xérophtalmie au 37ème jour. Tous étaient morts au 38ème jour. (fig. 10).

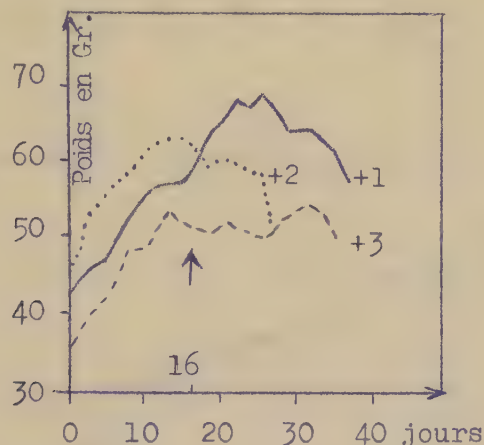


FIGURE 10

Courbes de croissance des rats du groupe I sans vitamine A₁

Les rats des groupes II et IV recevant respectivement 1,5 % de vitamine A₁ et 20 % d'époxyde de vitamine A₁ par jour n'ont présenté aucun signe de xérophtalmie.

Seul, le rat n° 2 du groupe III dont la dose d'époxyde de vitamine A₁ était de 10 % a présenté des signes oculaires légers au 36ème jour. Ces signes ont rétrocedé ensuite. Le rat n° 1 de ce groupe est mort de maladie le 20ème jour de l'expérience.

Tous les rats des groupes II, III et IV ont été sacrifiés le 49ème jour en vue de déterminer les réserves hépatiques de vitamine A₁.

Si l'on examine les courbes de croissance des rats des différents groupes, on constate que la dose quotidienne de 10 % d'époxyde de vitamine A₁ est suffisante pour provoquer une reprise de poids notable et la survie (fig. 11). Elle semble aussi suffisante pour prévenir les lésions de xérophtalmie bien que le rat n° 2 de ce groupe ait présenté de légers signes qui ont rétrocedé ensuite.

Cependant les courbes de croissance obtenues avec 10 % d'époxyde de vitamine A₁ sont assez éloignées de celles obtenues

COURBES DE CROISSANCE DES RATS

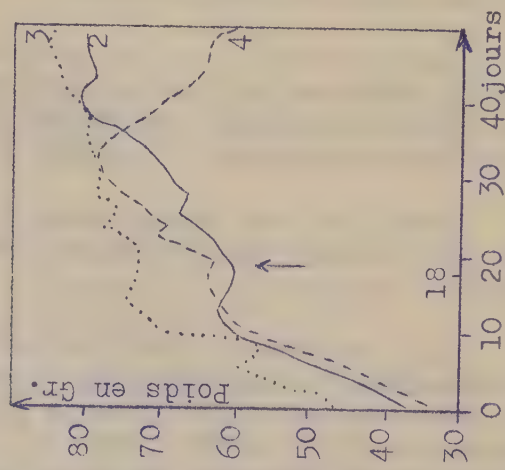


Fig. 11 - rats du groupe III recevant 10% d'époxyde de vitamine A₁

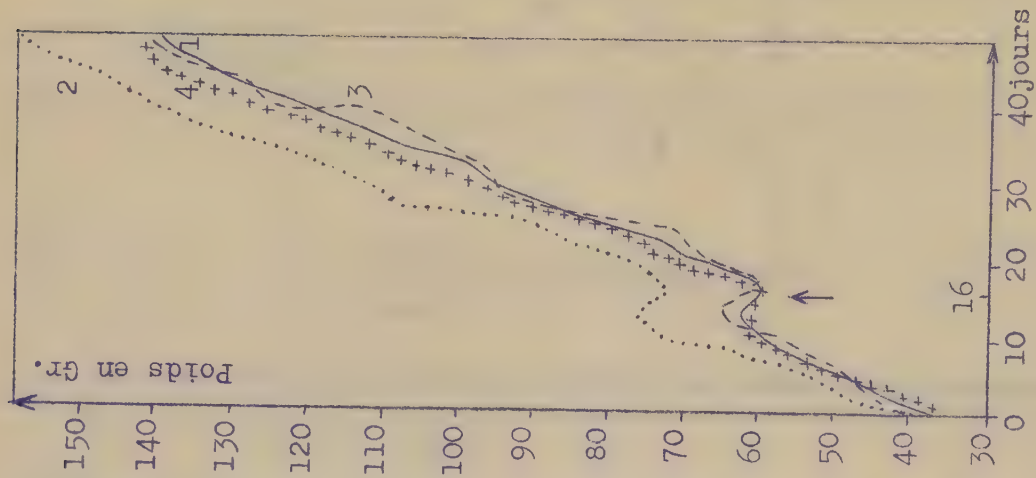


Fig. 12 - rats du groupe II recevant 1,5% de vitamine A₁

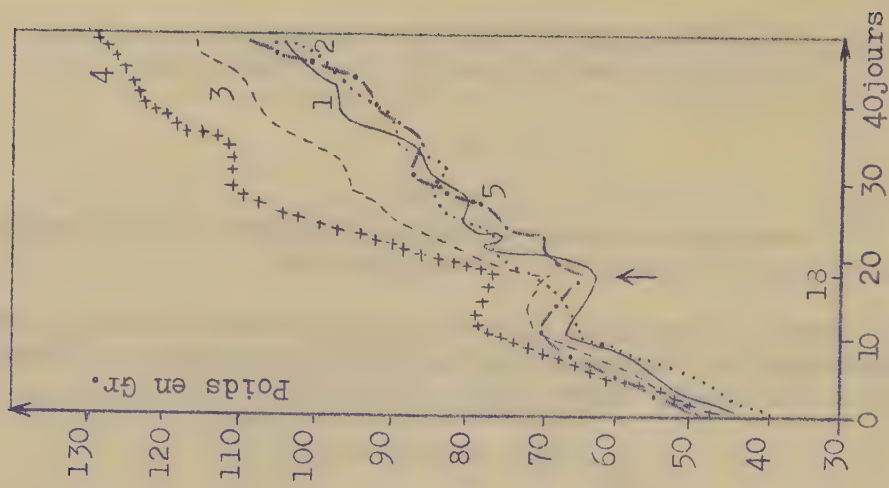
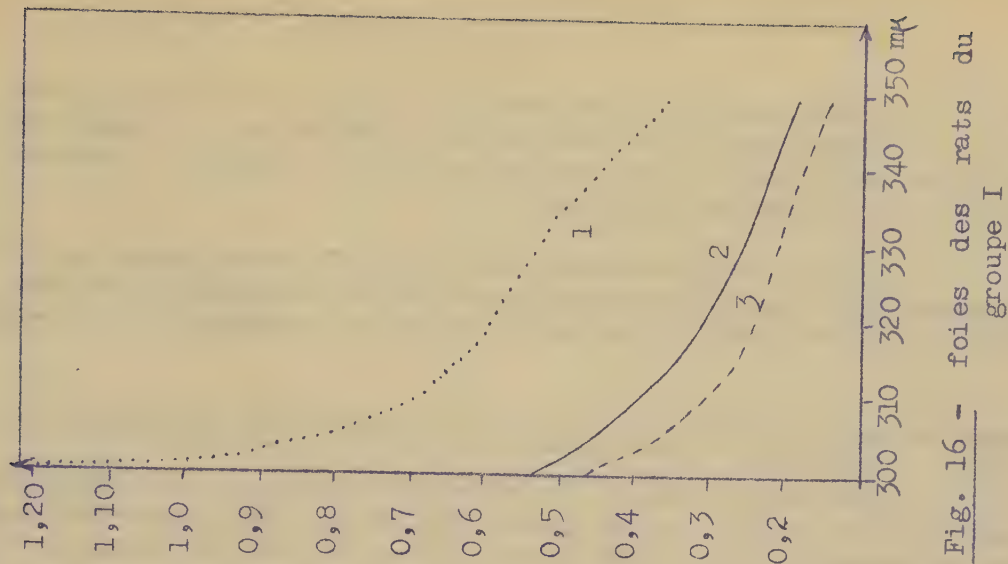
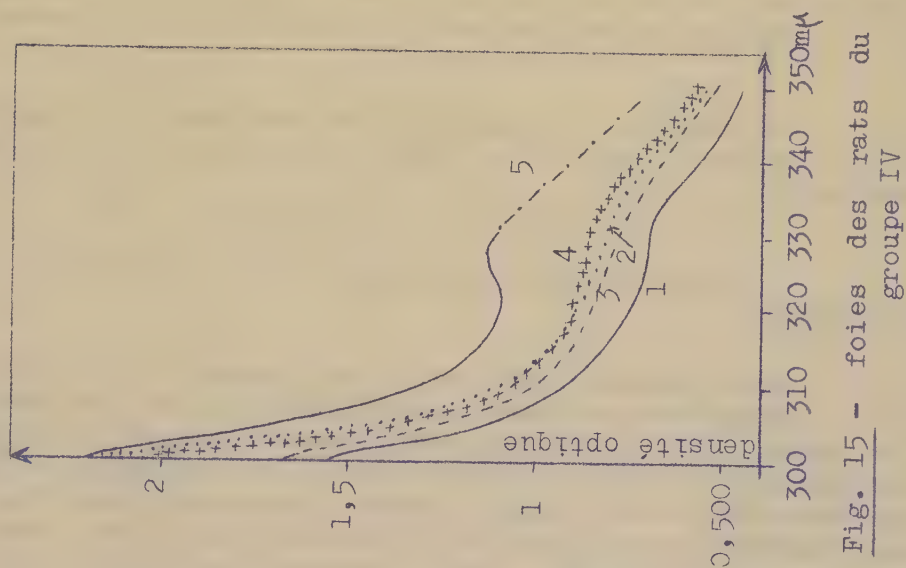
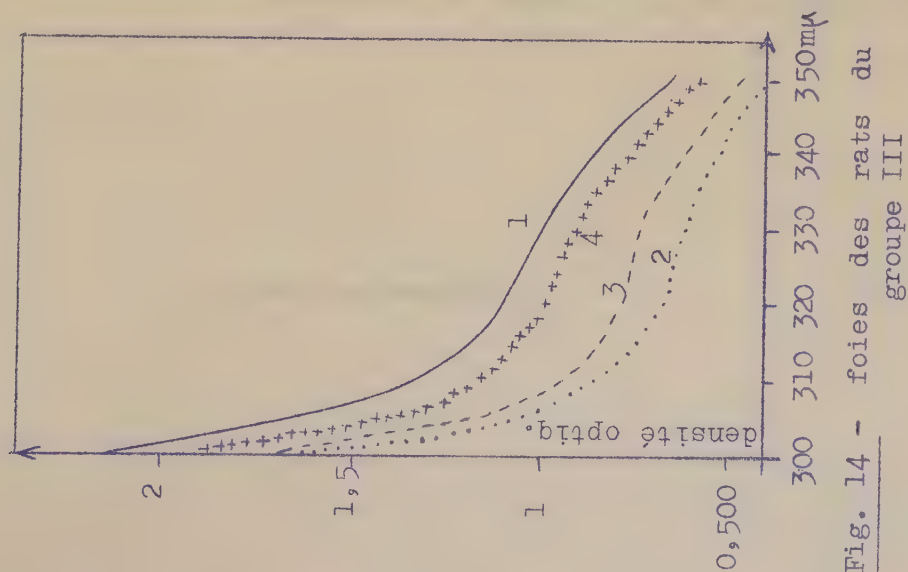


Fig. 13 - rats du groupe IV recevant 20% d'époxyde de vitamine A₁

COURBES D'ABSORPTION DES EXTRAITS HEPATIQUES



avec 1,5% de vitamine A₁ par jour (fig. 12). Au contraire avec une dose quotidienne de 20% d'époxyde de vitamine A₁, le gain de poids quotidien des rats se rapproche plus de celui des rats témoins recevant 1,5% de vitamine A₁ (fig. 13).

On peut donc conclure que l'époxyde de vitamine A₁ comme l'époxyde de rétinène₁ possède une activité vitaminique A₁ nette mais environ 20 fois plus faible que celle de la vitamine A₁ elle-même.

Recherche de la vitamine A₁ dans le foie des rats en expérience :

Nous avons utilisé la même technique que celle décrite dans l'essai biologique de l'époxyde de rétinène₁. Les courbes d'absorption des extraits hépatiques dans l'éther de pétrole examinés sous un volume de 5 cm³ montrent la présence de vitamine A₁ dans les foies des rats des groupes III (fig. 14) et IV (fig. 15). La recherche est négative dans les foies des rats ne recevant pas de vitamine A₁ (fig. 16).

De même que l'époxyde-5-6 du rétinène₁, l'époxyde de vitamine A₁ est donc susceptible d'être stocké par le foie sous forme de vitamine A₁.

CONCLUSIONS -

Nous pouvons faire en ce qui concerne l'activité biologique de l'époxyde de vitamine A₁ la même remarque que pour l'époxyde de rétinène₁. Ces corps sont capables de perdre leur oxygène et d'être métabolisés et mis en réserve par le foie comme la vitamine A₁ elle-même chez le rat blanc carencé. Cependant, dans l'un et l'autre cas, l'oxydation de la molécule d'axérophthol diminue très sensiblement l'activité biologique qui se trouve être 20 à 25 fois plus faible que celle de la vitamine A₁ elle-même.

CONCLUSIONS GENERALES

- 1°- L'oxydation de l'axérophtol par le permanganate acide ou le bioxyde de manganèse et la coupure oxydante du β -carotène par MnO_2 conduisent à l'obtention d'un corps auquel les spectres d'absorption et la préparation d'une 2-4-dinitrophénylhydrazone cristallisée nous ont permis d'assigner la structure d'époxyde-5-6 du rétinène₁. Ce corps peut aussi exister sous la forme dihydroxy-5-6 rétinène₁.
- 2°- Administré au rat blanc carencé en vitamine A₁, l'époxyde-5-6 du rétinène₁ ou corps "Y" présente une activité vitaminique A₁ 20 à 25 fois plus faible que celle de la vitamine A₁ elle-même. Il perd son oxygène dans l'organisme du rat et est mis en réserve dans le foie sous forme de vitamine A₁.
- 3°- Par sa bande à 560 m μ en état d'halochromie, l'époxyde-5-6 du rétinène₁ est considéré comme un "dominateur" de Granit. L'aisance avec laquelle il peut être obtenu par oxydation de la vitamine A₁ ou du rétinène₁ permet de penser qu'il pourrait dériver in vivo de l'un ou l'autre de ces deux corps dans des conditions réalisées dans la rétine.

D'autre part, les combinaisons qu'il donne avec les composés aminés (aniline, monométhylamine) suggèrent pour l'époxyde-5-6 du rétinène₁ la possibilité de formation in vivo d'un cycle semblable à celui de la rhodopsine et d'un rôle dans les processus visuels.
- 4°- La réduction de l'époxyde-5-6 du rétinène₁ conduit à la formation du véritable époxyde de vitamine A₁ absorbant à 285 m μ dans le chloroforme et 620 m μ dans une solution chloroformique de trichlorure d'antimoine (réactif de Carr-Price). Ce corps fournit par action de l'acide chlorhydrique son isomère furannique absorbant à 275 m μ dans le chloroforme et 575 m μ dans le trichlorure d'antimoine en solution chloroformique (réactif de Carr-Price). Nous identifions l'isomère furannique de l'époxyde de vitamine A₁ à l'époxy-vitamine A ou hépaxanthine préparée par Karrer.
- 5°- L'époxyde de vitamine A₁ administré au rat blanc carencé montre une activité vitaminique A₁ 20 à 25 fois plus faible que celle de la vitamine A₁. Comme l'époxyde-5-6 du rétinène₁, il perd son oxygène dans l'organisme du rat et est stocké par le foie à l'état de vitamine A₁.



DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

" CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE SUR PAPIER DES ACIDES AMINES -
- APPLICATIONS - "

Vu :
Les membres du Jury :

C. COURTY P. MEUNIER

C. MENTZER

Vu et approuvé :
Le Doyen de la Faculté des Sciences

DOUIN

Vu et accordé le permis d'imprimer.
LYON, le 15 Décembre 1951

Le Recteur :

André ALLIX

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - BALL S. , GOODWIN T.W. AND MORTON R.A. -
Biochem. J. a) 1946 , 40 , 59-60
b) 1948 , 42 , 516-523
- 2 - BALL S. , AND MORTON R.A. -
Biochem. J. 1949 , 45 , 298
- 3 - BALL S. , COLLINS F.D. , DALVI P.D. AND MORTON R.A. -
Biochem. J. 1949 , 45 , 304
- 4 - BLISS A.F. -
J. Gen. Physiol. 1946 , 29 , 277
1946 , 29 , 299
- 5 - BLISS A.F. -
Biol. Bull. 1949 , 97 , 221
- 6 - BRODA E.E. AND GOODEVE E.F. -
Proc. Roy. Soc. LONDON
1941-42 , B. 130 , 217
- 7 - BURNAUER , EMMET AND TELLER -
J. Am. Chem. Soc.
1938 , 60 , 309
- 8 - COLLINS F.D. AND MORTON R.A. -
Biochem J. 1950 , 47 , 3, 10, 18
- 9 - VAN DORP D.H. AND ARENS J.F. -
Nature 1947 , 160 , 189
- 10 - FARRAR K.R. , HAMLET J.C. , HENBEST H.B. AND JONES E.R.H. -
12^e Congrès International de Chimie Pure et
appliquée - NEW-YORK 10-13 Septembre 1951.
- 11 - FRIEDRICH A. - Traduit par LACOURT A. -
"La pratique de la microanalyse organique quanti-
tative - 1 vol.- Dunod 1939, 387 p., P. 310
- 12 - GIRARD A. et SANDULESCO G. -
Helv. Chim. Acta. 1936 , 19 , 1105
- 13 - GLOVER J. , GOODWIN T.W. AND MORTON R.A. -
Biochem. J. 1948 , 43 , 109-114

- 14 - GRANGAUD R. -
Recherches sur l'Astaxanthine, nouveau facteur
vitaminique A. Thèse Doct. Es Sciences LYON 1950
- 15 - GRANIT R. -
"Sensory Mechanisms of the Retina" 1947.
- 16 - HECHT S. et COLL -
Science 1938 , 84 , 331
- 17 - HERSHBERG E.C. -
J. Org. Chem. 1948 , 13 , 542
- 18 - HUBBARD R. AND WALD G.-
Proc. Natl. Acad. Sci.
1950 , 36 , 92
- 19 - HUBBARD R. AND WALD G.-
Proc. Natl. Acad. Sci.
1951 , 37 , 69
- 20 - HUNTER R.F. AND HAWKINS G.E. -
Biochem J. 1944 , 38 , 34
Nature 1944 , 153 , 194
- 21 - HUNTER R.F. AND WILLIAMS N.E. -
Chem. Soc. 1945 , p. 554
- 22 - KARRER P. UND JUCKER J. -
Helv. Chim. Acta. 1945 , 28 , 717
- 23 - KARRER P. -
Bull. Soc. Chim. Biol. 1946 , 28 , 695
- 24 - KARRER P. et COLL.-
Helv. Chim. Acta. 1946 , 29 , 1147 , 1149
(Cité par P. MEUNIER - Bull. Soc. Chim. Biol.
1948 , 30 , 185)
- 25 - KARRER P. UND JUCKER J. -
Helv. Chim. Acta 1947 , 30 , 559
- 26 - KUHN R. UND WINTERSTEIN -
Ber. Chem. Ges. 1931 , 64 , 326
- 27 - KUHN R. UND BROCKMANN H. -
Z. Physiol.Chem. 1932 , 206 , 41
- 28 - LEDERER E. -
Communication Personnelle.
- 29 - LYTHGOE R.J. -
J. Physiol. 1937 , 89 , 331
- 30 - LYTHGOE R.J. AND QUILLIAN J.P. -
J. Physiol. 1938 , 94 , 399

- 31 - MEUNIER P. -
C.R. Ac. Sc. 1942 , 215 , 470
- 32 - MEUNIER P. ET VINET A. -
Bull. Soc. Chim. Biol. 1945 , 27 , 186-190
- 33 - MEUNIER P. ET VINETA -
Chromatographie et Mesomerie - Paris 1947 -
Masson et Cie Edit.
- 34 - MEUNIER P. ET JOUANNETEAU J. -
Bull. Soc. Chim. Biol. 1948 , 30 , 185
- 35 - MEUNIER P. ET FERRANDO R. -
Bull. Soc. Chim. Biol. 1949 , 31 , 227-230
- 36 - MEUNIER P. , MALLEIN R. ET JOUANNETEAU J. -
Bull. Soc. Chim. Biol. 1949 , 31 , 965-969
- 37 - MEUNIER P. , ZWINGELSTEIN G. , JOUANNETEAU J. ET MALLEIN R. -
C.R. Ac. Sc. 1950 , 230 , 1323-1325
- 38 - MEUNIER P. JOUANNETEAU J., ET ZWINGELSTEING -
C.R. Ac. Sc. 1950 , 231 , 1170
- 39 - MEUNIER P. , MALLEIN R. , JOUANNETEAU J. ET ZWINGELSTEIN G. -
Bull. Soc. Chim. Biol. 1951 , 33 , 306-311
- 40 - MEUNIER P. , ZWINGELSTEIN G. , JOUANNETEAU J. ET MALLEIN R. -
C.R. Ac. Sc. 1951 , 232 , 2490-2491
- 41 - MILAS N. -
" Vitamins and Hormons" 1948 , p. 15
- 42 - MORTON R.A. AND GOODEVE T.W. -
Nature 1944 , 153 , 405
- 43 - MORTON R.A. , SALAH M.K. AND STUBBS A.L. -
Biochem. J. 1946 , 40 , LiX
- 44 - MORTON R.A. -
"Vitamins and vision"- Brit. J. Nutrit.
1951 , 5 , 100
- 45 - MOUTON M. -
Application de la 2-4 Dinitro-Phényl Hydrazine
à l'essai de quelques préparations galéniques.
-Thèse Pharm. - Paris 1938.
- 46 - SWERN D.E. -
J. Am. Chem. Soc. 1947 , 69 , 1692
(Cité par MILAS N. "Vitamins and Hormons"
1948 , p. 15

- 47 - WALD G. - J. Gen. Physiol. 1935 , 18 , 905-915
- 48 - WALD G. - J. Gen. Physiol. 1935 , 19 , 351-371
- 49 - WALD G. - J. Gen. Physiol. 1936 , 19 , 781-795
- 50 - WALD G. - J. Gen. Physiol. 1936 , 20 , 45-56
- 51 - WALD G. - J. Gen. Physiol. 1937 , 21 , 93-105
- 52 - WALD G. - Nature 1937 , 139 , 587
- 53 - WALD G. - Nature 1937 , 140 , 545
- 54 - WALD G. - J. Gen. Physiol. 1938 , 21 , 795-832
- 55 - WALD G. - J. Gen. Physiol. 1939 , 22 , 775
- 56 - WALD G. - Science 1945 , 101 , 653
- 57 - WALD G. - J. Gen. Physiol. 1948 , 31 , 489-504
- 58 - WALD G. , And HUBBARD R. -
J. Gen. Physiol. 1948-49 , 32 , 387
- 59 - WALD G. - Docum. Ophtalmologica. 1949 , 3 , 94
- 60 - WALD G. , DURELL J. , St. GEORGE R.C.C. -
Science 1950 , 111 , 179
- 61 - WALD G. , AND BROWN P.K. -
Proc. Natl. Acad.Sci. 1950 , 36 , 84
- 62 - WALD G. - Science 1951 , 113 , 287-291
- 63 - WENDLER N.L. , ROSENBLUM C. and TISHLER M. -
Am. Chem. Soc. 1950 , 72 , 234

TABLES DES MATIERES

	Pages
- <u>INTRODUCTION</u> -	13
- <u>PREMIERE PARTIE</u>	
- Préparation de l'Epoxyside-5-6 du Retinène ₁	17
- Préparation de la 2-4 Dinitrophenylhydrazine de l'Epoxyside 5-6 du Retinène ₁	26
- Constitution chimique de l'Epoxyside 5-6 du Retinène ₁	31
- Activité biologique de l'Epoxyside 5-6 du Retinène ₁	36
- Vitamine A ₁ et vision	40
- Chimie de la vision	46
- Possibilité de l'Epoxyside 5-6 du Retinène ₁ dans la chimie de la vision	49
- <u>DEUXIEME PARTIE</u>	51
- Epoxyside de vitamine A ₁	53
Préparation, constitution chimique, activité biologique.	
- <u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	63
- <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	67

Exécuté par Madame FAURE - 177, Rue Pierre Corneille - LYON.

